

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ



DIPLOMOVÁ PRÁCE

LIBEREC 2006

ŠTĚPÁNKA KRUTSKÁ

Technická univerzita v Liberci

Fakulta textilní

Obor: 3106 T 002 Chemická technologie textilní

MOŽNOSTI ENZYMATICKÉ DEGRADACE
TEXTILNÍHO ODPADU

POSSIBILITIES OF TEXTILE WASTE
ENZYMATIC DEGRADATION

Štěpánka Krutská

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Irena Horská

Konzultant: Ing. Jakub Wiener, Ph.D.

Rozsah práce a příloh:

Počet stran: 90

Počet tabulek: 14

Počet obrázků: 24

Počet příloh: 1

P r o h l á š e n í

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušila autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. O právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním diplomové práce v Univerzitní knihovně TUL.

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé diplomové práce a prohlašuji, že **s o u h l a s í m** s případným užitím mé diplomové práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědoma toho, že užít své diplomové práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

V Liberci, dne 3. 5. 2006

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi svými radami a připomínkami pomohli k dokončení této diplomové práce.

Děkuji především Mgr. Ireně Horské za odborné vedení a za pomoc při řešení problémů, které se při zpracovávání diplomové práce vyskytly. Také děkuji Ing. Jakubovi Wienerovi, Ph.D. za pomoc při zahájení diplomové práce, Ing. Vladimírovi Kovačičovi za spolupráci při snímkování vláken a Ing. Petru Rálkovi za pomoc s výpočetní technikou.

Dále bych velmi ráda poděkovala svým rodičům, spolužákům a známým, kteří mi byli po celou dobu mého studia důležitou oporou.

Anotace

V současnosti představuje likvidace textilního odpadu vzrůstající ekologickou i ekonomickou zátěž. Cílem této diplomové práce bylo ukázat, že enzymy, které se úspěšně používají v různých oblastech průmyslové činnosti, lze s výhodou využít i při degradaci textilního odpadu. Enzymy jsou totiž unikátními přírodními biokatalyzátory, které hospodárně udržují rovnováhu životního prostředí. K nalezení základních enzymatických mechanismů totální degradace textilního materiálu, které v odborné literatuře zatím absentují, je právě zaměřena tato práce. Zatím byla zkoumána biodegradace přírodních vláken – celulóзовého komplexu bavlny, lnu, konopí a proteinového komplexu vlněných vláken. Dosažené výsledky nastiňují možnost vytvoření ekologicky výhodné metody znehodnocení textilního odpadu, tak i účelného využití zbylého materiálu a hydrolyzátu.

Klíčová slova: degradace, enzym, textilní vlákno, ekologie

Annotation

Degradation of textile waste currently presents an increasing environmental and economic problem. To address this issue this thesis studies and demonstrates how commonly used enzymes may be successfully utilised to degrade textile waste as well. Reason for using enzymes is their ability to work as excellent natural bio-catalyzers balancing stability of natural environment. Work identifies basic enzymatic mechanism of degradation of textiles previously unpublished. To date this concept was proved for degradation of natural fibres - cellulosic complex of cotton, linen, hemp and albuminous complex of wool fibre. Attained results show not only the possibilities of environment-friendly method of textile waste degradation but also following utilisation of residual material and hydrolysates.

Keywords: degradation, enzyme, textile fibre, ecology

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	15
1. TEXTILNÍ ČÁST	15
1.1 Rozdělení textilních vláken	15
1.2 Přehled použitých textilních materiálů v práci	16
1.2.1 Bavlna	17
1.2.2 Len	21
1.2.3 Konopí	25
1.2.4 Vlna	28
1.2.5 Viskoza	31
1.2.6 Polyester	32
2. ENZYMOLOGICKÁ ČÁST	35
2.1 Struktura molekul enzymů	36
2.2 Mechanismus účinku enzymů	38
2.3 Vliv reakčních podmínek na účinnost enzymů	40
2.3.1 Vliv koncentrace substrátu a enzymu	41
2.3.2 Fyzikální vlastnosti prostředí	43
2.4 Klasifikace a názvosloví enzymů	44
2.5 Přehled použitých enzymů	45
2.5.1 Proteolytické enzymy	46
2.5.2 Glykosylasové enzymy	49
2.5.3 Esterasy	49
2.5.4 Seznam použitých enzymů v práci	50
3. BIOTECHNOLOGIE	51
3.1 Přednosti a nevýhody	52
3.2 Biotechnologické směry a použití	52
3.3 Průmyslová mikrobiologie	54
3.3.1 Růst a množení mikroorganismu	54
3.3.2 Vliv vnějšího prostředí na růst mikroorganismů	56

3.3.3	Kultivace mikroorganismů	57
3.3.4	Bioreaktory	58
3.4	Zpracování biomasy na ethanol	59
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....		60
4.	ENZYMATICKÁ DEGRADACE TEXTILNÍHO MATERIÁLU.....	60
4.1	Výběr a předúprava textilních materiálů	60
4.2	Výběr vhodných enzymů pro hydrolýzu	61
4.3	Stanovení hmotnostních úbytků materiálu enzymatickou hydrolýzou jednotlivými enzymy	61
4.4	Sestavení enzymatických kaskád.....	67
4.5	Stanovení hmotnostních úbytků enzymatickými kaskádami.....	67
4.6	Chromatografické testování hydrolytických štěpů	72
4.6.1	Chromatografické testování směsí proteolytických enzymů	72
4.6.2	Vybrané chromatogramy	73
4.7	Možnosti využití zbylých hydrolyzátů	75
4.8	Vliv barvení textilního materiálu na enzymatickou digesci	76
5.	DISKUSE VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR.....	80
Bibliografie:		85
Dodatek A - Obrazová příloha.....		87

Seznam použitých zkratek

aj.	a jiné
apod.	a podobně
atd.	a tak dále
C	uhlík
Ca	vápník
Co	kobalt
Cr	chrom
č.	číslo
EC	enzymová komise
fy	firma
H	vodík
ISO	International Standards Organization
IUB	Mezinárodní Unie Biochemie
O	kyslík
K	draslík
kap.	kapitola
N	dusík
Na	sodík
např.	například
obr.	obrázek
popř.	popřípadě
př. n. l.	před naším letopočtem
resp.	respektive
S	síra
tj.	to jest
TUL	Technická Univerzita v Liberci
tzn.	to znamená
tzv.	tak zvaný

Seznam použitých fyzikálních veličin

c	koncentrace
cm	centimetr
g	gram
hod	hodina
kg	kilogram
konst.	konstanta
l	litr
m ³	metr krychlový
mg	miligram
min	minuty
ml	mililitr
mm	milimetr
nm	nanometry
s	sekunda
T	teplota
t	čas
V _c	objem celkový
μl	mikrolitr
μm	mikrometr

ÚVOD

Se stárnutím a znehodnocováním předmětů kolem nás se lidstvo setkává už odnepaměti. Celý vesmír je založen na dualitě vznik-zánik, na neustálé přeměně těchto dvou kvalit. Žádná věc, látka nebo organismus se nemůže ubránit působení času a výpadům parazitních činitelů. U některých věcí toto znehodnocení pozorujeme takřka denně. Příkladem je zkažení přezrálého ovoce nebo přeměna spadaného listí na humus. U jiných předmětů je hlodání času nenápadné a spíše si všimneme mechanického opotřebovávání.

Při archeologických objevech se odkrývá mnoho předmětů, které vypovídají o způsobu a chování našich prapředků i o tehdejší světě. Jsou to předměty z materiálů odolnějších vůči zubu času jako předměty a ozdoby z kovu, kamenů a keramiky. Není výjimečností najít při potápění v moři úlomky starověkých amfor, keramiky či platidel.

Avšak textilní fragmenty se nalézají v půdních vykopávkách jen zřídka. O způsobu oblékání tehdejší společnosti se nejčastěji dozvídáme z malířského a sochařského umění, později z písemných pramenů. Většinu textilních fragmentů nacházíme v podobě pohřebních oděvů a pokrývek, gobelínů, koberců či jiné textilní výzdoby v hrobkách a v podobě textilních malířských pláten. Tyto textilie byly v podstatě neúmyslně zakonzervovány a degradační proces byl významně zpomalen. Přírodní textilní materiál je totiž snadno napadán mikroorganismy, plísněmi a houbami, které mají negativní vliv na jeho stabilitu a životnost. Mezi textilní vlákna, výhradně používaná až do poloviny minulého století, totiž patřila přírodní vlákna jako len, bavlna, vlna nebo hedvábí.

Vysvětlení, jak biodegradace v přírodě probíhá přineslo až 18. století. Už ale starověké národy jako Egypťané, Řekové, Římané, Číňané či Arabové cítily, že zde musí být nějaká neviditelná síla způsobující, že vše živé se mění. Tajemná síla schopná sama od sebe přeměňovat jakoukoliv hmotu v hmotu jinou: mléko v sýr, šťávu z ječmene v pivo, mošt ve víno nebo těsto v chléb [1]. Významný švédský chemik a lékař Jöns Jacob Berzelius napsal, že v živočiších a rostlinách probíhají tisíce katalyzovaných reakcí, za které byly zodpovědné biokatalyzátory. Nejdříve byly tyto biokatalyzátory nazvány fermenty. Toto označení zavedl Fabrony (1787) jako odvození od slova fermentace, tj. od rozkladných procesů používaných odnepaměti při výrobě potravin a nápojů. Název ferment je dodnes používán v některých jazycích [2].

Označení enzym (z řeckého en zýme = v kvasnicích) pochází od německého profesora Williho Kühneho (1878). Prvním popsáním enzymem byla amylasa ze sladu (1814), dalším pak slinná amylasa a žaludeční proteasa pepsin (1830 až 1840). Koncem 19. století se začínají formovat i první představy o mechanismu katalytického účinku enzymů: teorie komplementarity (E. Fisher 1894) a představa o vzniku komplexu enzym-substrát jako meziprojektu (V. Henri 1902). Kinetika jednosubstrátových reakcí byla zpracována Leonorem Michaelisem a Maude L. Mentenovou v roce 1913. Od roku 1926 byla prokázána bílkovinná povaha enzymů americkým chemikem Jamesem B. Sumnerem. Za tuto práci byl později oceněn i Nobelovou cenou. Od tohoto roku byly enzymy studovány v rámci chemie bílkovin a dodnes bylo podrobně popsáno přes 3000 různých enzymů. U řady z nich je známá primární i prostorová struktura molekuly a je podrobně popsán mechanismus jejich působení [2].

Nejstarší způsob enzymové katalýzy je znám z oblasti potravinářské technologie (příprava sýrů, kynutého těsta, alkoholických nápojů). V posledních 20ti letech ale našly enzymy velké uplatnění v textilním a kožedělném průmyslu, stejně jako ve farmaceutickém a lékařském průmyslu, biodegradaci odpadních vod či při extrakci kovů z rud. V textilním průmyslu se enzymy výhodně využívají jako úpravnické prostředky při procesu zušlechťování i při modifikaci vláken.

Prvními enzymy, které byly použity ve značném rozsahu a dodnes si zachovaly prvenství v objemu výroby, byly proteasy pro biologicky aktivní práci prostředky. Jedná se o enzymy relativně laciné (vzhledem k masovému charakteru jejich výroby), jejich produkce v západní Evropě představuje zhruba 50% celkové výroby enzymů [3].

Hojně se enzymy využívají v předúpravě bavlněných tkanin v operačním kroku odšlichtování. Účelem odšlichtování je odstranit šlichtovací přípravky z bavlněné tkaniny, které zlepšují zpracování přízí při tkaní. Šlichty na bázi přírodních polymerů, tedy škrobové šlichty, se bezpečněji a efektivněji odstraňují pomocí enzymů. Enzymatická technologie přináší řadu výhod, např. nepoškozuje vlákna, je ekologická a přináší i energetické výhody. V případě enzymatického odstraňování šlichty se škrob hydrolyticky štěpí katalytickým působením amylotických enzymů (amylas) na nízkomolekulární složky až nakonec vznikají jednoduché vypratelné cukry [4].

Při finálních úpravách denimu jsou enzymy (cellulasy) nepostradatelnou součástí, neboť při praní velmi ekonomicky a šetrně zajišťují klasický „odřený“ efekt.

Biodegradace se také již dlouho využívá při získávání lýkových vláken ze

stonků. Operace se nazývají rosení a máčení, při nichž se využívá přirozeného napadání pazdeří stonku plísněmi a výsledkem je získání technických vláken. Rozdělením technických vláken na jednotlivá elementární vlákna se zabývá další biologická operace nazvaná kotonizace [5].

Další velkou oblastí uplatnění enzymů je modifikace keratinových vláken. Účelem je zlepšení jejich fyzikálních a povrchových vlastností i zlepšení barvitelnosti [6, 7].

V rozvoji je nový způsob předúpravy vyvářky bavlněných vláken. Tato operace se používá k získání dobré a stejnoměrné savosti, která má rozhodující význam pro kvalitní provedení zušlechťovacích operací bavlny jako bělení, barvení, tisk nebo finální úpravy. Vyvářka se provádí za varu působení alkalické lázně (NaOH), která odstraní hydrofobní příměsi z kutikuly vlákna [4]. Použitím enzymů (pektinasa, lipasa), působících rozklad hydrofobních příměsí, se výrazně usnadňuje proces předúpravy bavlny. Výhodou je energetická úspora a minimum odpadů chemikálií [7].

Další směr výzkumu [7] je modifikace polyesterových vláken pomocí enzymu esterasy nebo enzymatická úprava polyakrylonitrilových vláken pro snazší barvitelnost.

Cílem moderních textilních biotechnologií je tedy nahradit standardní chemické postupy zpracování textilních surovin metodami enzymatickými. Vývoj těchto metod přináší řadu výhod, jak ekologických tak i ekonomických. V tomto směru jsou publikovány již stovky vědeckých prací.

Likvidace textilního odpadu v tomto směru představuje globální ekologickou i energetickou zátěž, protože ve většině evropských zemí se z technických a organizačních důvodů znehodnocují textilní odpady jen v omezené míře. Textilní odpad je využíván jen při výrobě koberců, střešní lepenky a pro výrobu čistícího textilu. Většina textilního odpadu končí především na skládkách či ve spalovnách, nebo je likvidována „těžkou“ chemií za vzniku nerecyklovatelných škodlivých zbytků.

Biotechnologické technologie znehodnocení textilního odpadu znamenají elegantní řešení. Zatímco zušlechťování textilních materiálů využívá, hlavně, fenoménu tzv. parciální (limitované) enzymatické hydrolýzy nežádoucích chemických substancí, degradace textilního odpadu by měla být založena na principech totální enzymatické degradace. K nalezení základních enzymatických mechanismů totální biodegradace přírodních textilních materiálů je právě zaměřena tato práce, která navazuje na studii [8].

Jde hlavně o totální degradaci lignocelulózového a pektinocelulózového komplexu bavlny, lnu a konopí. Dále jde o degradaci proteinových komplexů vlněných vláken.

Informace odborné literatury v tomto vytýčeném problému jsou velmi roztříštěné a mají pouze technický charakter [9, 10]. Exaktní biochemicko-enzymologické studie v podstatě neexistují. Pro výzkum se používají výhradně komerční směsi enzymů [11, 12, 13] nebo se zkoumá přímé působení mikroorganismů a plísní na textilní materiál z hlediska skladování a nežádoucího znehodnocování [14]. Dle dostupné literatury je v tomto ohledu tato práce první ucelenější studií a je pochopitelně zaměřena na možnosti totální biodegradace pouze přírodních vláken. Možnosti enzymatické degradace chemických textilních materiálů byly studovány pouze v případě polyesterových a viskózových vláken a to jen okrajově.

Rozpadové nízkomolekulární látky enzymatické hydrolýzy přírodních textilních materiálů by se dále měly využít jako vstupní látky k dalším biosyntézám. Velkou oblastí využití by mohl být zemědělský, kosmetický, farmaceutický nebo automobilový průmysl.

TEORETICKÁ ČÁST

1. TEXTILNÍ ČÁST

Vlákna tvoří základní surovinu pro textilní průmysl. Období, kdy se lidé naučili zpracovávat vlákna, není možné ani přibližně stanovit. Historicky nejdříve vznikla potřeba nitě jako spojovacího prostředku. To se datuje do doby začátku společenského vývoje člověka, do mladšího paleolitu.

S používáním ohně se začal člověk stěhovat i do chladnějších oblastí. Vzrostla tedy i nutnost se něčím chránit a udržovat si teplo i mimo dosah hřejivých plamenů. K tomuto účelu dobře posloužily kůže, ale bylo třeba je nějak spojit. Drobné spojovací předměty byly předchůdci dnešních nití. V teplejších oblastech se pralidé zahalovali do vzhlednějších rostlinných rohoží. Ty byly odvozeny od již známého pletení košů.

Vzájemně spojenými kožešinami se člověk odíval ještě v neolitu. Do tohoto období se datují i první znaky textilní výroby. Nejstarší archeologicky doložená textilní výroba pochází ze 7. tisíciletí př. n. l. Z této doby totiž pocházejí nálezy zbytků textilií v různých tkalcovských vazbách.

Jak se textilní a oděvní výroba rozvíjela a jaké trendy nyní převažují můžeme posoudit pouhým pohledem kolem sebe. Textilie pronikly a našly uplatnění téměř ve všech oblastech lidského působení, od klasických oděvů a bytových doplňků, přes lékařský a stavební materiál, až k vesmírnému výzkumu a inteligentním textiliím.

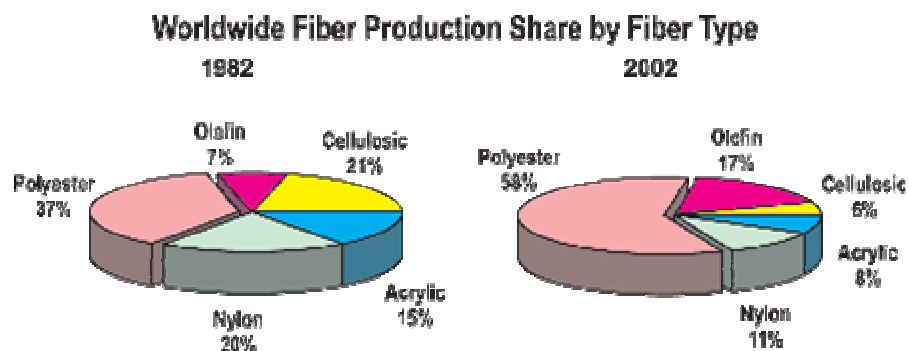
1.1 Rozdělení textilních vláken

Textilní vlákna lze rozdělit podle různých hledisek, např. podle původu, geometrických rozměrů, chemického složení nebo způsobu zpracování. Základní klasifikace je podle textilního hlediska na vlákna přírodní, chemická z přírodních polymerů a chemická ze syntetických polymerů.

Zatímco sortiment přírodních vláken je vcelku ustálen, syntetická vlákna prodávají neustálý vývoj. Některé druhy ztrácejí postupně na významu, jiné jsou v bouřlivém rozvoji a různě se modifikují, což přináší zlepšení jejich vlastností a maximální využití vláken.

V roce 2002 byla roční produkce vláken 36 milionů tun, což je 155 % nárůst za posledních dvacet let [15]. Syntetická vlákna z toho tvoří až 94 % celkové produkce.

Přírodní celulózová vlákna mají klesající tendenci výroby, ale i přesto se ročně vyrobí přes 2,2 milionů tun. Kladem celulózových vláken je i jejich nezastupitelná role, zvláště pro oděvní, bytový průmysl a oblast lékařství. Objemové podíly jednotlivých druhů vláken ukazuje *obr. 1*.



Obr. 1 Světová produkce vláken v roce 1982 a 2002 [15]

1.2 Přehled použitých textilních materiálů v práci

Seznam konkrétně použitých textilních materiálů se zkratkou normy ISO

Přírodní	rostlinná	BAVLNA	CO
		LEN	LI
		KONOPI	HA
	živočišná	VLNA	WO
Chemická z přírodních polymerů		VISKOZA	CV
Chemická ze syntetických polymerů		POLYESTER	PES

1.2.1 BAVLNA

Úvod

Bavlněná vlákna patří mezi přírodní rostlinná vlákna. Vlákna se získávají ze semen bavlníku (*Gossypium*), kde přímo vyrůstají na pokožce semene, obr.2.



Obr. 2 Rostlina a otevřená tobolka bavlníku

Archeologické nálezy ve východní Indii dokazují používání bavlny již v 3. a 4. tisíciletí př. n. l. Na počátku našeho letopočtu byla bavlna pěstována v Egyptě i jiných zemích v okolí Středoziemního moře. V Americe byla bavlna známá dlouho před příchodem Kryštofa Kolumba. Do Evropy proniklo používání bavlny až mnohem později a to velmi těžce. Záhy se ale stala bavlna velmi používanou surovinou, díky svým kladným užitným vlastnostem.

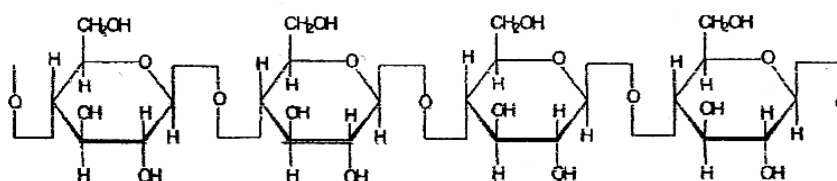
Chemické složení

Chemické složení bavlněného vlákna je různé podle druhu a zralosti bavlny, sklizně, půdních i povětrnostních podmínek pěstitelské oblasti. Průměrné složení bavlněného vlákna je dle [16]:

88 – 96 %	celulózy
0,9 – 1,2 %	pektinů
1,1 – 1,9 %	bílkovin
0,3 – 1 %	vosků
0,5 – 1 %	organické kyseliny
0,7 – 1,6 %	minerální látky
0,3 %	cukru
0,9 %	ostatní

Po technologickém zpracování předúpravou se z bavlněného vlákna odstraní rozpustné látky (část pektinů, bílkovin, vosků a organických kyselin) a získá se vlákno až s 99 % celulózy.

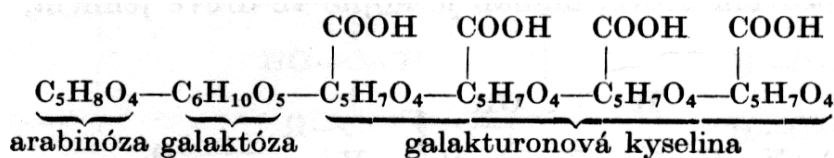
Celulóza je nejrozšířenější organickou látkou na zemi. Sumární vzorec je $(C_6H_{10}O_5)_n$. Strukturní vzorec je vyobrazen na *obr. 3*. Chemicky jde o polyalkohol s jednou primární a dvěma sekundárními hydroxylovými skupinami. Celulóza je polysacharid, jehož základní stavební jednotkou je β -glukopyranóza spojená do polymeru 1,4-glykosidickými vazbami. Základní strukturní jednotkou celulózy je disacharid celobióza. Navázáním několika tisíc základních jednotek β -glukózy vzniká makromolekula celulózy v bavlně. Průměrný polymerační stupeň bývá 10 800 [16, 17]. Prostorovým uspořádáním polymeru celulózy je židličková forma.



Obr. 3 Vzorec celulózy

Přítomnost alkoholických skupin významně ovlivňuje fyzikální, fyzikálně-chemické a chemické vlastnosti celulózy. Mezi alkoholickými skupinami celulózy vznikají vodíkové můstky. Tyto vazby mohou nastávat nejen mezi různými molekulami (intramolekulární vazby), ale i uvnitř jedné molekuly (intermolekulární vazby). Tím se dostávají řetězce do těsnějšího kontaktu a vzájemně na sebe energeticky působí. Celulóza je tedy látka málo reaktivní, což je dáno právě jejím chemickým složením a strukturou [17].

Základní jednotku **pektinu** tvoří kyselina galakturonová společně s arabinózou a galaktózou, *obr. 4*.



Obr. 4 Základní jednotky pektinu

Pektinové příměsi v bavlněném vlákne jsou prezentovány různou kombinací kyseliny polygalakturonové, její soli s hořčíkem, methylesterem a xylózou.

Bílkoviny jsou zastoupeny kyselinou asparágovou, glutamovou nebo prolinem, zbytkem protoplazmy v lumenu.

Vosky jsou ve formě vyšších jednomocných alkoholů, např. kyselina palmitová a olejová, nebo triaocanol a glycerin.

Z **minerální solí** se vyskytují oxidy křemíku vápníku, draslíku a hořčíku, dále chlornany, sírany a fosforečnany.

Kyselina L-maleinová a soli kyseliny citrónové se zařazují mezi **organické kyseliny**.

Z **cukrů** se zde objevuje glukóza, galaktóza a fruktóza.

Mezi **další látky** v celulóзовém vlákne se zařazují pigmenty.

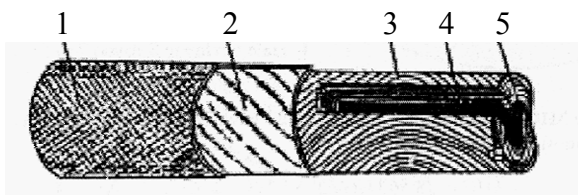
Morfologie vlákna

Vlákno bavlny je jednobuněčné [16, 17]. Skládá se z voskové kutikuly (primární stěna) na povrchu, buněčné vrstvy (sekundární a terciální stěna) a lumenu uvnitř vlákna, *obr. 5*. Podle nových studií se již neodlišuje mezi kutikulou a primární vrstvou vlákna [18].

Vlákno nejprve vyrůstá do délky přibližně 25 dnů, tzn. že první se utváří primární stěna. Teprve potom začne vlákno získávat na objemu tím, že se na vnitřní straně stěny primární začne vrstevnatě ukládat stěna sekundární.

Primární stěna je jen 0,1 až 0,5 μm tenká, je složená z 50 % celulózu, vosky, pektiny a proteiny. Pektin má zde důležitou spojovací funkci a poskytuje tak primární stěně vhodnou soudržnost a pevnost. Uložení vosku má zase velký význam pro ochranu celého vnitřního komplexu vlákna před působením vody a ztrátou vodorozpustných průvodních látek. Směr molekul celulózy v primární stěně je otočen o 90 ° proti směru krystalitům celulózy stěny sekundární a tvoří strukturu stočené spirály.

Sekundární vrstva, tloušťky kolem 4 μm , se výrazně liší složením i strukturou od



Obr. 5 Model bavlny: 1 – primární stěna, 2 – přechodová lamela, 3 – sekundární stěna, 4 – terciální stěna, 5 - lumen

vrstvy primární. Skládá se z více než 95 % celulózy. Celulóza leží v řadách koncentrických růstových kruhů neboli lamel, které odráží noční kolísání teplot během růstu vlákna. Kvůli vysokým

denním teplotám má bavlněné vlákno vegetační růst pouze v noci [17]. Jedná se o C4 rostliny. Ve zralém vlákne je těchto lamel 25 až 40. První lamela uložená na vnitřní

straně primární vrstvy je známá jako transitivity (přechodová) lamela. Poslední hraniční lamela s lumenem je někdy nazývána jako terciální stěna. Osa krystalitů sekundární stěny je o 30 ° skloněna oproti podélné ose vlákna.

Lumen je tvořen podlouhlou dutinou uvnitř vlákna, která vznikla po otevření tobolky bavlny a vyschnutí protoplazmy.

Celulózové řetězce jsou v bavlně uspořádány do paralelních uskupení zvaných krystalinity a následné větší seskupení je označeno jako fibrily. Elementární fibrila je složena z 36 celulózových řetězců a je považována za základní krystalickou jednotku bavlny. Elementární fibrily se seskupují do formy mikrofibril, následně se pak o větších agregátech hovoří jako o makrofibrilách [18].

Rozdílné studie morfologie bavlněného vlákna se liší v rozměrech jednotlivých fibril, ale typickou velikostí elementárních fibril je 3,5 – 10 nm, mikrofibril 10 – 40 nm a makrofibril 60 – 300 nm. Prostorové uspořádání elementárních fibril i větších formací rozhoduje o celkové morfologii a vlastnostech vlákna [16, 17, 18].

V podélném řezu pod mikroskopem se bavlněné vlákno jeví jako stužka mírně zkroucená, v průřezu má pak ledvinovitý tvar se zřetelně vyvinutým lumenem u zralého vlákna. Ledvinovitý průřez je charakteristickým jevem zralého bavlněného vlákna, který je způsoben vyschnutím protoplazmy v lumenu a rozdílnými oblastmi hustoty sekundární vrstvy [18].

Vlastnosti vlákna

V závislosti na klimatických podmínkách pěstitelské oblasti se bavlněná vlákna liší barvou, která je bílá, krémovitá až hnědá s matovým leskem. Dále pak délkou vláken od 10 mm do 65 mm a různým stupněm zralosti. Měrná hustota vláken se pohybuje okolo 1530 kg.m⁻³ [16, 17]. Mezi kladné vlastnosti bavlněného vlákna patří relativní pevnost, schopnost absorpce potu a příjemný omak.

1.2.2 LEN



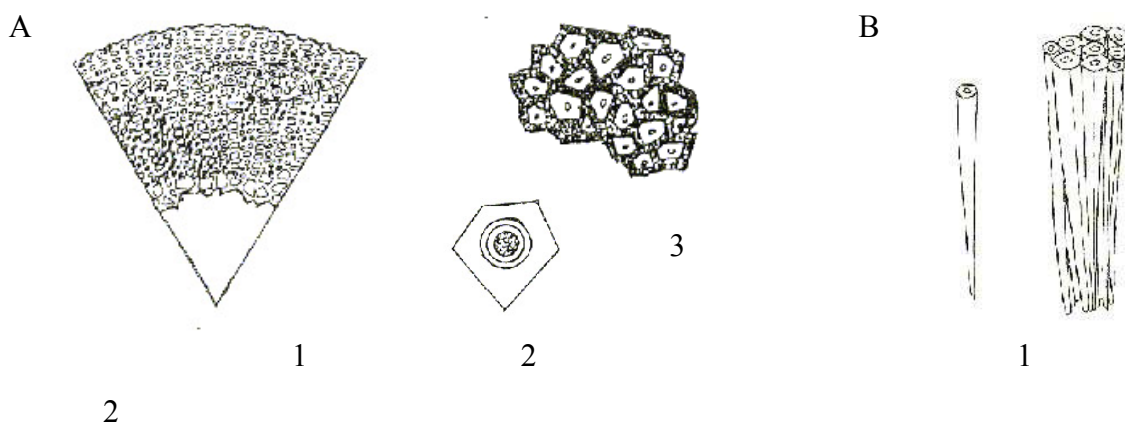
Obr. 6 Len

Úvod a vlastnosti

Len patří mezi nejstarší textilní rostliny, *obr. 6*. O lněných látkách je zmínka již v bibli v knize Genesis a Exodus. Dokonce se tvrdí, že v dobách faraónů se v Egyptě tkali lněné látky neporovnatelně jemnější než jsou dnešní lněné tkaniny.

Lněná vlákna patří mezi přírodní vlákna. Získávají se ze stonku lnu (*Linum usitatissimum*, *Linum sativum*), kde jsou vlákna uložena v lýkových svazcích, *obr. 7*.

Lněný stonek je složen ze tří částí: vnější kůry, dřevoviny a dřeně uvnitř stonku. Kůra obsahuje parenchym, v němž jsou lýková vlákna spojena pektiny s parenchymem. Lýková vlákna nejsou tvořena jedinou buňkou, ale řadou buněk spojených rozpustnými pektiny. Je tedy možné lněné vlákno rozdělit na jednobuněčná elementární vlákna. Technické vlákno obsahuje 15 – 30 elementárních vláken. Délka technického vlákna je 20 – 140 cm a tloušťka 200 – 300 μm . Elementární vlákno má délku 15 – 40 mm a tloušťku 10 – 30 μm . Izolace elementárních vláken se provádí biologickými, fyzikálními, chemickými a mechanickými procesy. Biologicky se provádí rosením nebo máčením [5].



Obr. 7 Struktura stonku a vlákna lnu

A – anatomická stavby stonku: 1 – průřez stonkem, 2 – průřez svazkem vláken, 3 – průřez elementárním vláknem
B – podélný pohled: 1 – elementární vlákno, 2 – svazek vláken

V příčném řezu je elementární vlákno tvaru pěti až sedmibokého úhelníku s ostrými špičkami a výrazným lumenem. V podélném pohledu jsou vidět charakteristická kolénka.

Zralé lněné vlákno je lesklé a hladké světle žluté barvy. Je pevnější než bavlna, má však malou tažnost. Jeho měrná hustota se pohybuje v rozmezí 1460 až 1500 kg.m⁻³ [16, 17]. Dobře přijímá vlhkost a vyznačuje se chladivým omakem.

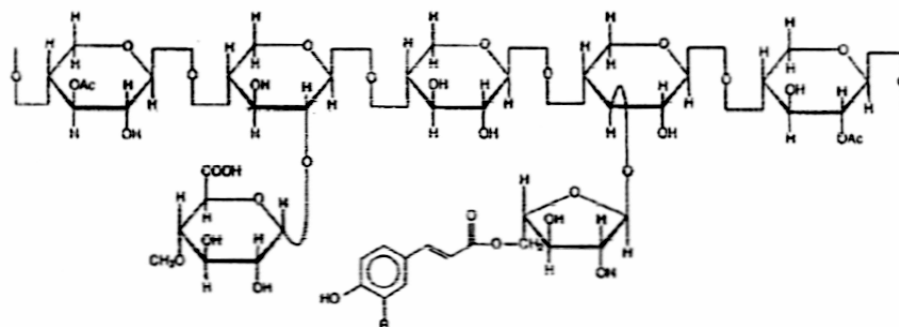
Chemické složení vlákna

Kvalita a chemické složení lněného vlákna je závislá na včasné sklizni, půdních i povětrnostních podmínkách pěstitelské oblasti. Lněné vlákno obsahuje průměrně podle [5]:

70 - 75 %	celulózy
2 - 7 %	pektinů a hemicelulózy
1 – 3 %	ligninů
1 – 3 %	bílkovin
1 – 2 %	tuků a vosků
1 – 2 %	popelovin
7 - 12 %	vlhkosti

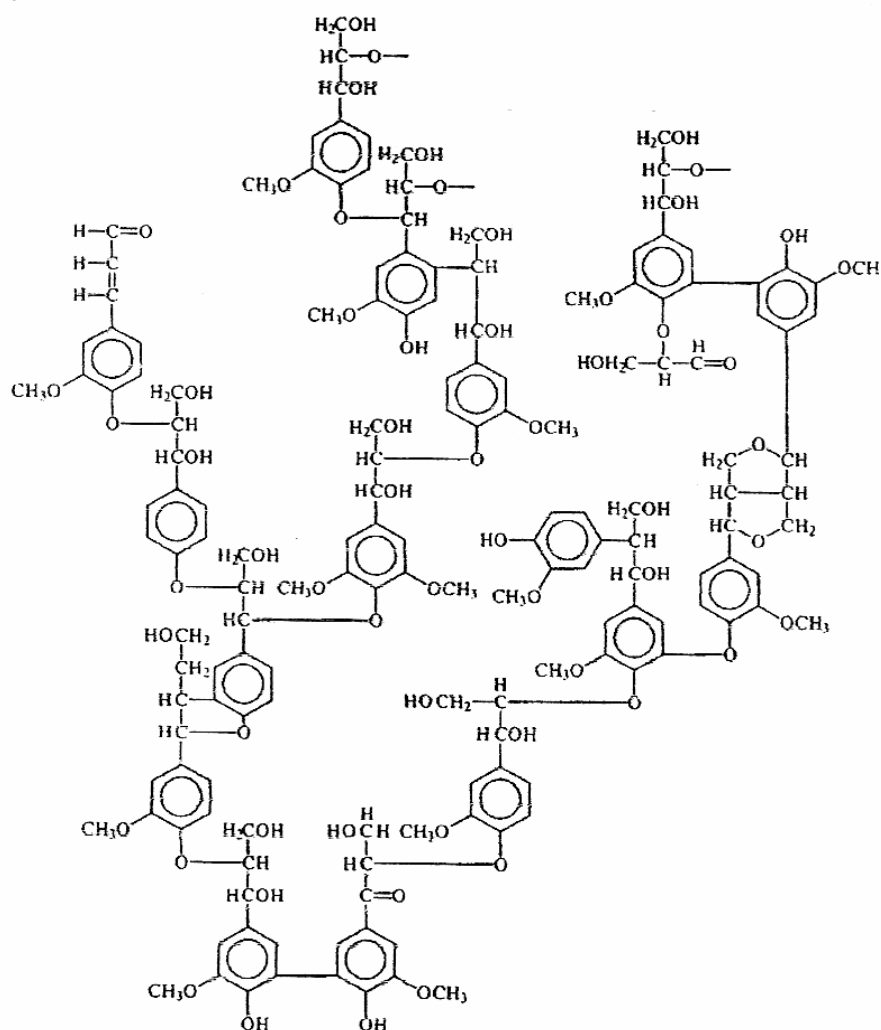
Celulóza byla podrobněji popsána v kap. 1.2.1. Rozdíl bavlněné celulózy a celulózy ve lnu spočívá pouze ve vyšším průměrném polymeračním stupni. U lněného vlákna má celulóza průměrný polymerační stupeň 36 000 [16, 17]. Díky takto vysokému průměrnému polymeračnímu stupni je celulózový polymerní řetězec více krystalický než u bavlny. Lněné vlákno má tedy vyšší pevnost, ale je křehčí, má tužší omak a snadněji se mačká.

Hemicelulózy jsou lineární polysacharidy, *obr. 8*, vysokomolekulární látky s průměrným polymeračním stupněm 100 až 200 jednotek, ve vodě jsou většinou nerozpustné. Hlavní strukturní jednotkou jsou hexózy (glukóza, galaktóza, manóza) a pentózy (xylóza a arabinóza). Tyto látky se objevují v hemicelulózách v různých kombinacích. Jinou skupinu hemicelulóz tvoří polyurovové kyseliny (polymer D-galakturové kyseliny a poly-D-manonová kyselina).



Obr.8 Vzorec hemicelulózy [19]

Struktura **ligninu** je velmi složitá, obr. 9, v různých rostlinách je budován z různých látek. Základní jednotkou ligninů jsou fenyl propanové jednotky různě substituované, spojené etherovou vazbou.



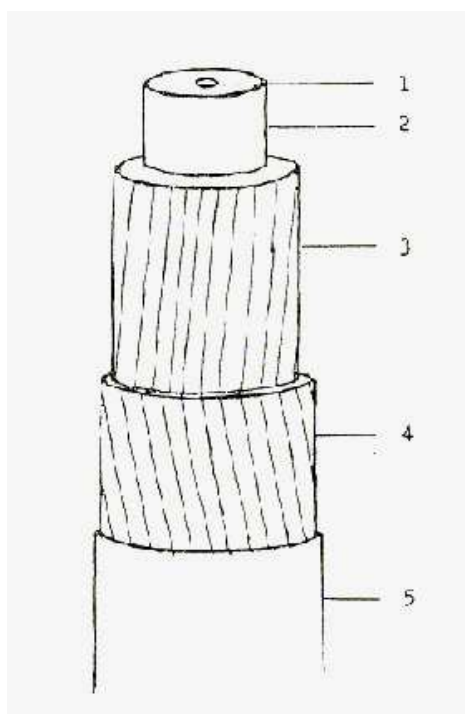
Obr. 9 Vzorec ligninu [19]

Vosky a tuky jsou více než z 80 % nezmýdelnitelné. V nezmýdelněném podílu byl nalezen ceresin, cerylalkohol, fytosterin, ve zmýdelnitelném kyselina stearová, palmitová, olejová, linolová, linoleová. Pro vysoký nezmýdelnitelný podíl se tukové a voskové látky dosti nesnadno odstraňují z vlákna při zušlechťování a jejich zbytky po zasušení v přízi způsobují její značnou hydrofobitu.

Popeloviny jsou tvořeny anorganickými látkami jako vápenatými, hořečnatými, sodnými a draselnými kationty.

Morfologie vlákna

Stěna elementárního vlákna se skládá ze čtyř částí [5], a to střední, primární, sekundární a terciální lamely, *obr. 10*.



*Obr. 10 Model vlákna lnu [5]
1 – lumen, 2 – terciální lamela,
3 – sekundární lamela, 4 – primární
lamela, 5 – střední lamela*

Střední lamela tvoří společnou stěnu vlákna s okolními buňkami. Základem je pektin, obtížně rozpustný ve vodě, a lignin. Na jejich tloušťce a chemickém složení značně závisí charakter a pevnost vlákna.

Primární lamela je uložena pod střední lamelou a je velmi tenká. S postupující zralostí stonku se v ní zvyšuje i obsah ligninu.

Na primární lamelu navazuje směrem dovnitř buňky stavebně komplikovaná stěna sekundární lamely. Ta tvoří podstatnou část buněčné stěny. Je složena z několika vrstev, které nejsou jednotně uspořádány a netvoří je ani kompaktní hmota. Vrstvy jsou složeny ze svazku fibril, které jsou v jednotlivých vrstvách různě spirálovitě uloženy. Spirality je levotočivého směru. Ve lnu jsou tedy tyto svazky směřovány tak, že se vysychající

navlhčené vlákno stáčí doprava. Toto je rozlišovacím znakem při identifikaci líného vlákna, neboť další lýkové vlákno konopí se stáčí doleva [16].

Terciální lamela následuje za lamelou sekundární a tvoří pružnou tenkou stěnu. Všechny složky elementárního vlákna mají četné póry a podílejí se na nasákavosti vlákna.

Po celé délce elementárního vlákna prochází vnitřní částí stejnoměrná kanálkovitá dutina zvaná lumen. V lumen se nachází zbytky zaschlé protoplazmy a vřetenovitá buněčná jádra. Čím tlustší je stěna vlákna, tím menší je dutina. Lumen má pravidelný okrouhlý tvar.

1.2.3 KONOPÍ



Obr. 11 Konopí

Úvod

Konopná vlákna patří mezi přírodní rostlinná vlákna. Vlákna jsou součástí lýka stonku rostliny konopí (*Cannabis sativa*). Jde o prastarou kulturní rostlinu, vyobrazenou na obr.11, která pochází pravděpodobně ze střední Asie, odkud se používání konopného vlákna rozšířilo do Číny, Indie, Japonska, Egypta a do Evropy.

Struktura stonku je velmi podobná stonkům lněným, je však daleko hrubší. Konopný stonek může dosáhnout až čtyř metrů, pokud má dobré pěstitelské podmínky. Na povrchu je kryt kůrou zvanou epidermis. Uvnitř stonku jsou technická lýková vlákna a dřevěné jádro zvané pazdeří. Technické vlákno mívá typicky délku 100 – 200 cm [16]. Lýková vlákna jsou uspořádána ve svazku. Každý svazek obsahuje jednotlivá elementární vlákna, která jsou ohraničena středovou lamelou. Vlákna jsou dvojího druhu [16] – použitelná primární vlákna (5 – 55 mm) a krátká sekundární vlákna (2 mm). Izolace elementárních vláken se provádí analogicky jako u lnu, kap. 1.2.2.

Chemické složení

Kvalita a chemické složení konopného vlákna je závislá především na odrůdě konopné druhy rostliny, na včasné sklizni a půdních podmínkách pěstitelské oblasti. Surové konopné vlákno má průměrné chemické složení podle [19]:

55 - 72 %	celulózy
7 – 19 %	hemicelulózy
2 – 5 %	ligninů
4 – 8 %	pektinů
0,7 – 1,3 %	tuků a vosků
4 %	popelovin
10 - 12 %	vlhkosti

Výše uvedené složky konopného vlákna jsou stejné chemické podstaty jako u vlákna lněného, kap. 1.2.2. Rozdíl mezi konopím a lnem spočívá především v objemovém množství jednotlivých komponent.

Hlavní funkcí **celulózy** je poskytovat dostatečnou pevnost vláknu. Hlavní rolí **hemicelulózy** je umožnění vazby mezi celulózou a ligninem. **Lignin** je zpevňujícím materiálem umístěným mezi celulózové mikrofibrily. Zlepšuje vláknitou pevnost a poskytuje dostatečnou ochranu před působením vnějších vlivů. Díky vysoké molekulové hmotnosti, rozvětvené struktuře a vazbě s hemicelulózou je nerozpustný v řadě rozpouštědel. Lignin je spojen s hydroxylovými skupinami polysacharidů celulózy a hemicelulózy etherovou vazbou.

Semikrystalické vosky se skládají z řady esterů, dlouhých alkalických řetězců nebo vosků s alkoholovou skupinou. Právě alkoholy zahrnují většinu vosku, estery a olejové kyseliny jsou také velmi běžné, ale vyskytují se pouze v omezeném množství. Funkcí voskové vrstvy je hlavně předejít ztrátě vody z vlákna.

Hlavními **minerály** ve vláknech jsou vápník, draslík, fosfor a hořčík. Obsah minerálů v rostlině závisí na zemědělských a půdních podmínkách.

Morfologie vlákna

Morfologie lnu je téměř shodná se strukturou lnu. Rozdíl spočívá ve větší robustnosti konopného vlákna a ve směru sklonu fibril ve vrstvách sekundární lamely. Fibrily u konopí se stáčí opačně než u lnu. Spirály fibril sekundárních vrstev má směr pravotočivý. Následně směr otáčení navlhčeného vysychajícího vlákno je doleva [16].

Taktéž pod mikroskopem se konopné vlákno výrazně podobá lnu, je však mohutnější. V příčném řezu se jeví jako mnohoúhelník se zaoblenými rohy s výraznějším lumenem na rozdíl u lnu. V podélném pohledu jsou znatelná charakteristická kolénka [16, 17].

Vlastnosti vlákna

Kvalitnější vlákna jsou bílá až stříbrnošedá, horší mají barvu tmavší až hnědou. Pevnost vlákna je dobrá, zvláště za mokra. Měrná hustota vlákna se mění v rozpětí 1480 až 1500 kg.m⁻³ [16, 17]. Toto vlákno, nejlépe ze všech přírodních vláken, odolává povětrnostním vlivům a velmi dobře i vlhku.

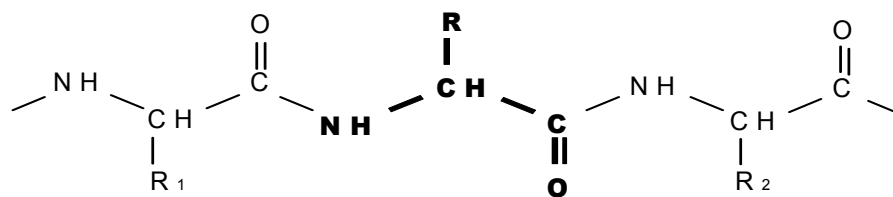
1.2.4 VLNA

Úvod

Vlna se řadí mezi přírodní vlákna živočišného původu. Vlněné chlupy vyrůstají z vlasových váčků (folikul). Na 1 cm² ovčí pokožky jich roste zhruba 10 tisíc, jedna ovce má celkově přibližně 100 milionů chlupů. Vlněné vlákno se získává se stříží ovci domácích (*Ovis aries*). Vlna se hodnotí podle svého druhu, stáří, pohlaví ovce a podle kvality rouna.

Složení a morfologie ovčího vlněného vlákna

Podle dostupné literatury [16, 17, 20] je vlněné vlákno buněčné struktury, kde jsou jednotlivé α -aminokyseliny navzájem spojeny polypeptidickou vazbou, *obr. 12*.



Obr. 12 Vzorec polypeptidického řetězce

Vlákno je složeno ze tří oblastí: kutikuly, kůry (kortexu) a dřeně (meduly). Kutikula tvoří šupinovitý kryt povrchu vlákna, kortex je jádrem vlákna a medula je vnitřní centrální dutina, jejíž povrch tvoří buněčné stěny. Každou z těchto oblastí tvoří jiný druh buněk. Mezi šupinkovitým povrchem a jádrem vlny, i uvnitř jádra, je beztvářá matrix jako pojivo.

Povrch keratinových vláken obaluje **kutikula**, která má většinou tvar šupin, různě velikých a různě uspořádaných. Údajně se skládá z epikutikuly na povrchu, pod ní je exokutikula a endokutikula.

Hlavní podíl vlněného vlákna tvoří jeho jádro - **kortex**, uložené pod ochrannou šupinovou vrstvou. Jádro se skládá z kortikálních buněk spojených mezibuněčnou hmotou (intracelulární matrix).

Kortex je prostoupen makrofibrilami a mikrofibrilami. Matrix je beztvářá rozptýlená bílkovinná hmota z globulárních proteinů s vysokým obsahem síry.

Kortex má bilaterální strukturu. To znamená, že je složen ze dvou svazků, lišící se v chemickém, fyzikálním a koloristickém chování. Bilaterální kortex je šroubovitě stočen a právě poměr mezi ortokortexem a paracortexem určuje zkadeření vlny. Ortocortex má lépe definované fibrily, je zde více tyrosinu na rozdíl od paracortexu, kde je více cystinu.

Medula je dřevná dutina vytvořená nekrotickou tkání slouženou z pigmentovaných hranatých buněk, které jsou umístěny v ose vlákna. Tento svazek může být souvislý nebo přerušovaný.

Tento všeobecně uznávaný model vlněného vlákna je však již zastaralý a informace o chemickém složení jsou značně nejasné a nejednotné. Tento model dává pouze zevrubnou představu o vlněném vlákne, detailní soudobé vědecké studie na toto téma však v odborné literatuře chybí. Proto ani pro enzymatické biotechnologie nemůže poskytnout dostatečně ucelené a jasné informace [3]. Je to logické, neboť k efektivní proteolýze je potřeba znát konkrétní rozvrstvení jednotlivých proteinových komponent vlákna, tedy enzymatických substrátů.

Pro moderní popis vlny je nutná analýza s již detailně prozkoumaným lidským vlasem. Teprve po srovnání s lidským vlasem jsou k dispozici moderní údaje, které uspokojivě vysvětlují výsledky enzymatické digestce vlněného vlákna [3, 8].

Při soudobém rozboru vlněného vlákna [3] se tedy vychází z názoru, že v posledních cca 75 milionech let se v kožních derivátech savců nic nového nestalo, změny jsou pouze na úrovni funkční modifikace.

Složení a morfologie lidského vlasu

Biochemické složení a morfologie srsti savců je nejlépe prozkoumána analýzou lidského vlasu. Lidský vlas, stejně jako ovčí chlup, je keratinovým derivátem doplněným řadou proteinů. Dělí se na tři vrstvy [21] - dřev, kůru a kutikulu. Přirozený rozdíl je ve struktuře intraepidermální, tzn. na úrovni vlasového bulbu, ze kterého vlas vyrůstá, a ve struktuře extraepidermální. Ve vlastní, extraepidermální, struktuře lidského vlasu jsou tyto tři vrstvy primárně tvořeny nekrotickými zrohovatělými buňkami. Chemickým složením i fyzikálními vlastnostmi se však jednotlivé vrstvy značně liší.

Dřeň je výrazná hlavně u silnějších typů vlasů, je především vyvinuta u srstí zvířat. U člověka se skládá z jedné nebo dvou řad zrohovatělých buněk. Tyto buňky ztratily svůj původní tvar a vytváří nepravidelné hvězdčité či pilovité struktury. Původní buněčné stěny se mění ve fibrilární keratinové struktury. Dřeň je dále doplněna vzduchovými vakuolami a zrny pigmentu.

Kůra je složena z více vrstev keratinizovaných buněk. V kůře je silně vyvinut systém keratinových tonofibril.

Kutikula vytváří svrchní obal vlasu. Je tvořena systémem nekrotických, plochých keratinizovaných buněk. Tyto buňky vytvářejí charakteristické šindelovité překrývající se šupinky na povrchu vlasu.

Vnější lidský vlas je tedy chemicky velmi složitým konglomerátem skleoproteinů, doprovodných dalších pojivových komponent, lipidů a pigmentů. Tento složitý komplex je již fyziologicky inaktivní. Je bez cévního zásobení a inervace. Zcela stejná je situace je i u vlasu zvířecí srsti.

Intraepidermální tvorby vlasu se, na úrovni bulbu, zúčastňují tři základní typy buněk. Jsou to buňky epiteliální, které tvoří hlavně obalové vrstvy vývojových fází vlasu. Pak jsou to buňky produkující základní skleroprotein vlasu – keratin (keratinocyty) a buňky doprovodné, zvané retikulocyty. Retikulocyty mohou vylučovat retikulinová i elastická vlákna. Exaktní imunohistochemické studie v tomto směru zatím chybí.

Morfologie i složení lidského vlasu tvoří sice velmi nedokonalý, ale v praxi vyhovující systém. Humánní histologie se totiž věnuje především vlasovému bulbu a intraepidermálním strukturám. Průmysl zpracování srstí se naopak zajímá hlavně o vlastní stavbu chlupu a jeho užitné vlastnosti. Toto srovnání vlněné srsti a lidského vlasu ale už poskytuje nové informace a dokáže lépe osvětlit průběh a výsledky enzymatických biotechnologií [3, 8].

1.2.5 VISKÓZA

Úvod

Viskózové vlákno se řadí mezi chemická vlákna vyráběná z přírodních polymerů, konkrétně z regenerované celulózy. V roce 1892 byl objeven způsob rozpouštění celulózy přes vytvoření přechodného derivátu (xantogenátu) C. F. Crossem, E. J. Bevanem a C. Beadlem. Výroba viskózového vlákna započala ve firmě Courtaulds v roce 1904 [16].

Tato vlákna jsou laciná, ale jejich základní nevýhodou je ekologicky i zdravotně neúnosný způsob výroby. Prošla dlouhým technologickým vývojem, v současné době je rozdělujeme na viskózová vlákna normálního a speciálního typu.

Výroba vlákna

Vlákna se vyrábějí z celulózy, základní surovinou pro výrobu je dřevo smrkové nebo bukové, které se převádí mletím na celulóзовou drť.

Dále se zpracovává na alkaliceleulózu, která se převede na xantogenát celulózy, který se rozpustí v alkálii a po protlačení tryskou koaguluje v spřádací lázni. Tento proces má mnoho obměn a variací.

Morfologie vlákna

Výrobní technologií se získá vlákno z regenerované celulózy s průměrným polymeračním stupněm 300 – 600, výrazně nižším než u bavlny. Vlákno získá při prodloužení fibrilární strukturu, ve fibrilách se střídají krystalické a amorfní oblasti, které jsou spojeny intrafibrilárními vaznými řetězci.

Při koagulaci se utvoří radiálně proměnná struktura [16]. Silně orientovaná a dobře uspořádaná forma kutikuly se nalézá na povrchu vlákna. Uvnitř se nachází kora (35 % hmoty vlákna) a dřev (65 % hmoty vlákna). Kora je složena z malých, dobře orientovaných krystalitů. U dřev je méně pórovitá makrostruktura s většími méně orientovanými krystality.

Podle tvaru zvláknování trysky lze tvar průřezu vlákna libovolně měnit, nejčastěji se používá kruhová tryska. Při koagulaci se uvnitř vlákna tvoří plyny, které

difundují ven a následkem toho je tvorba laločnatého průřezu. Povrch vlákna viskózy bývá tedy hluboce rýhovaný.

Vlastnosti vlákna

Lesk viskózového hedvábí je značně vysoký, většinou se chemicky snižuje. Omak je chladivý a velmi příjemný na rozdíl od ostatních syntetických vláken. Důsledkem radiální struktury je vlákno málo odolné v ohybu, tedy velmi mačkové. Měrná hmotnost bývá v rozmezí 1500 až 1520 kg.m⁻³ [16]. Pevnost je poměrně dobrá, ale drastický pokles mechanických vlastností nastává ve vodě. Následkem toho byla vyvinuta vlákna speciální se zlepšenými vlastnostmi.

1.2.6 POLYESTER

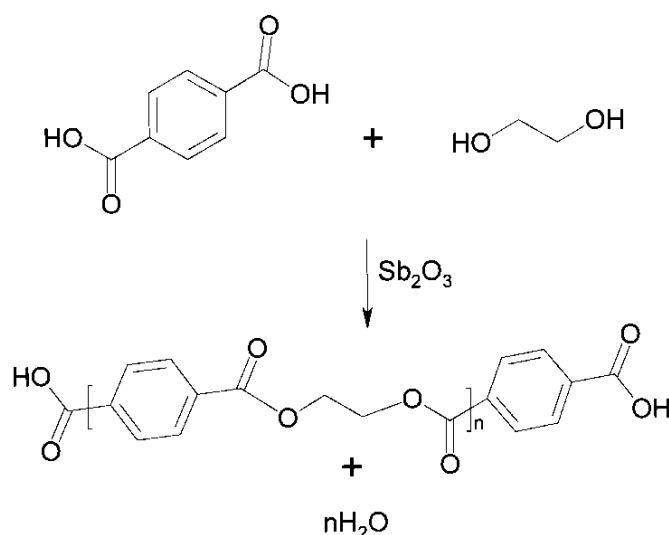
Úvod

Polyesterové vlákno zaujímá přední místo mezi syntetickými polymery. První patenty na polyesterové vlákno podali Whinfeld a Dickson v roce 1941 [16].

Složení a výroba vlákna

Polyesterové vlákno je kondenzační produkt s esterovou vazbou v hlavním řetězci. Klasická polyesterová vlákna nesou chemický název polyethylen tereftalát.

Ten se vyrábí přímou esterifikací kyseliny tereftalové a ethylenglykolu, ukázáno na *obr. 13*, při 270 - 290 °C za vakua nebo předesterifikací dimethyl tereftalatu.



Obr. 13 Reakce kyseliny tereftalové a ethylenglykolu za vzniku ethylen tereftalátu

Při změně počtu methylenových skupin vznikají další druhy polyesterů jako polytrimethylen tereftalát, polybutylen tereftalát nebo polyethylen 2,6- naftalát [16].

Polyesterová vlákna z kyseliny tereftalové a ethylenglykolu mají však některé nepříznivé vlastnosti, které ztěžují výrobu vláken a jejich zušlechťování. Mezi modifikační komponenty proto patří kyselina izoftalová, kyselina 5-sulfoizoftalová, polyethylenglykol nebo kyselina adipová [16].

Při výrobě vláken se uplatňuje zvláknování z taveniny, následuje dloužení a fixace, avivování a řezání. Při dloužení probíhá krystalizace a orientace řetězců polyesteru, nedloužená vlákna jsou totiž prakticky amorfní [16].

Morfologie vlákna

Výsledkem dloužení se získá fibrilární struktura [16]. Fibrila je složena z krystalické oblasti, amorfní fáze a orientované nekystalické fáze. Orientovaná nekystalická fáze jsou napjaté vazné řetězce, které odpovídají za řadu mechanických vlastností polyesteru. Velikost fibrily je v průměru 30 – 45 nm. Krystality ve fibrile jsou skloněny o 5 ° vzhledem k ose vlákna.

Krystalická struktura elementární jednotky je triklinická. Aromatická část polyesteru je planární formy. Aromatická jádra v molekule podmiňují přítomnost vysokého podílu krystalitů a vysokou orientaci těchto krystalitů. Skupiny alifatické jednotky mohou existovat v různých konformacích. V krystalickém polyesteru se vyskytuje trans-konformace, v amorfním převládá gauche-konformace [20].

Vlastnosti vlákna

Mechanické vlastnosti polyesterového vlákna jsou závislé na přípravě vláken, obecně jsou velmi dobré. Měrná hmotnost krystalické fáze je kolem 1440 kg.m^{-3} , měrná hmotnost amorfní fáze 1330 kg.m^{-3} [16]. Vláknem se snadno udržuje, ale vykazuje vysokou žmolkovitost. Nízká navlhavost způsobuje snadné nabití elektrostatickým nábojem.

2. ENZYMOLOGICKÁ ČÁST

Pro přísun energie a stavebního materiálu pro růst a vývoj organismů vytvořila biologická evoluce složitou síť metabolických procesů. Řízení a koordinaci tohoto organizovaného a vysoce integrovaného souboru chemických reakcí realizují enzymy, tzv. **biokatalyzátory**. Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, které urychlují průběh chemických reakcí žádoucím směrem. Z termodynamického hlediska tak vychylují energetický potenciál daného systému proti energetické rovnováze.

Enzymy se podílejí na realizaci všech biochemických procesů buňky. Celkově je známo přibližně 70 tisíc nejrozličnějších enzymů. Enzymy jsou základním „vynálezem“ evolučního vývoje života. Vznik lipoproteinové membrány umožnil tvorbu precelulárních a abiotických mikroskopických váčků (koacervátů). Tyto uzavřené jednotky, pasivně, obsahovaly jiné chemické složení než obsahovalo jejich okolí. Stabilita těchto mikroskopických struktur byla ohrožována termodynamickými difúzními procesy, hlavně osmózou. Biologická evoluce proto musela vyvinout mechanismy transportu relativně jednoduchých látek proti koncentračnímu gradientu. Těmito selektivními přenašeči byly jednoduché bílkoviny, které je možno označit za určitý typ „praeenzymů“. Evoluční biologie se domnívá, že tyto enzymatické jednotky zabudované do primitivních lipoproteinových membrán měly funkci esterasy.

Dokázaly na sebe vázat a štěpit v okolí se vyskytující cukerné fosfáty za uvolnění užitečné energie. Cukerný zbytek potom dokázaly přenést proti koncentračnímu gradientu do nitra koacervátu. V diferenciaci prvních buněk a v procesu vzniku prvních organismů docházelo i k bouřlivému vývoji nových a specifitějších typů enzymů. Evoluce biologického života této planety opustila sacharidový a polysacharidový model biologické variability již v raných prahorách. Konstrukce „života“ a jeho variabilita byla svěřena bílkovinám, které jsou odolnější a variabilnější. Základní enzymatické funkce byly definitivně svěřeny stále komplexnějším makromolekulám bílkovin. Je nutné si uvědomit, že katalytické enzymatické funkce těchto bílkovin zůstaly stejné. Jejich složení (zejména primární aminokyselinová sekvence) se však dramaticky měnila.

V současném biologickém systému od bakterií až po člověka je tedy známo asi 70 tisíc enzymů. Tato klasifikace se však týká pouze jejich **specifity**, tj. počtu známých

realizovaných reakcí. Bílkovinná struktura těchto enzymů v rámci jednotlivých druhů však může dosahovat řádově miliard. Specifitu enzymů studuje katalytická biochemie a histochemie na základě štěpitelnosti konkrétních substrátových molekul. Variabilita vlastních enzymatických bílkovinných makromolekul se projevuje vzájemně odlišnou antigenicitou. Tuto oblast studuje imunologie, imunochemie a imunohistochemie.

Z komplexního charakteru metabolismu organismů plynou vysoké nároky na specifitu enzymů. Řídí totiž rychlosti reakcí, které cíleně probíhají podle přesného geneticky fixovaného plánu. Enzymy tedy musí zajišťovat specifický průběh těchto reakcí bez vzniku vedlejších produktů, musí pracovat v přesné návaznosti a koordinaci. Aktivita enzymů musí být pružně regulovatelná podle měnících se potřeb organismů. Složité struktury enzymů jsou však citlivé k řadě vlivům a poměrně rychle se opotřebovávají. Jsou tedy látky, které jsou neustále odbourávány a znovu syntetizovány.

2.1 Struktura molekul enzymů

Enzymy patří mezi **globulární bílkoviny**, jsou z 60 až 70 % povahy složených bílkovin, hlavně glykoproteiny [2]. Prvním enzymem, u něhož byla určena primární struktura, byla ribonukleasa z hovězího pankreatu v roce 1960. Molekula této hydrolasy, štěpící fosfodiesterové vazby v molekulách RNA, je tvořena jediným holým polypeptidovým řetězcem se 124 aminokyselinovými zbytky a čtyřmi disulfidovými můstky. Je dokázáno, že molekuly enzymů jsou tvořeny podle stejných stavebních principů jako molekuly jiných typů bílkovin a v jejich kovalentní struktuře platí i stejné zákonitosti.

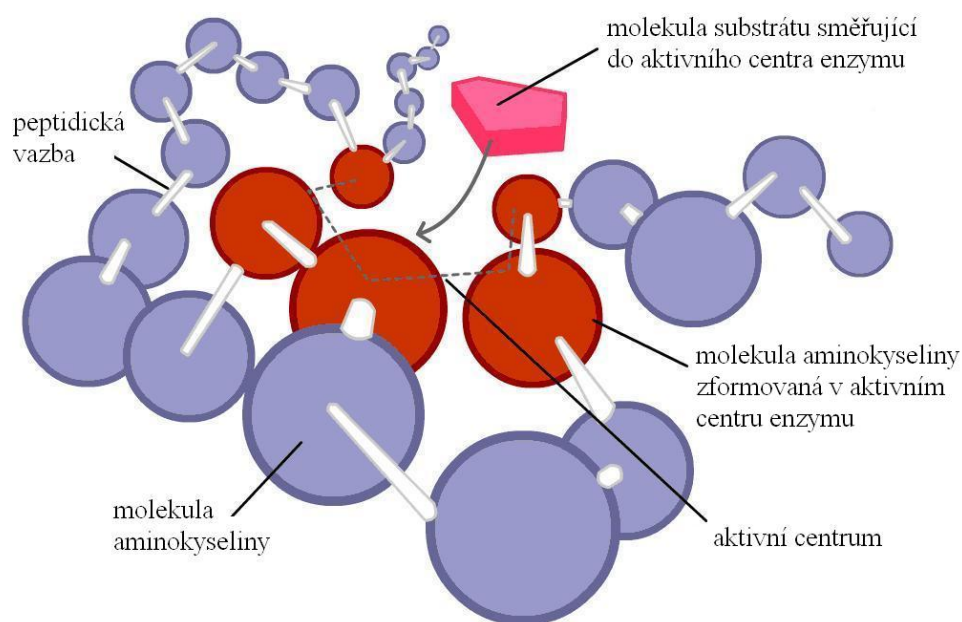
Součástí molekul enzymů povahy složených bílkovin jsou nízko molekulové neaminokyselinové struktury nazývané **kofaktory**. Jejich funkce spočívá v přenosu atomů, jejich skupin nebo elektronů při biochemických reakcích, které enzymy katalyzují. Je-li kofaktor pevně vázán na bílkovinnou složku enzymu, považuje se za stabilní součást molekuly a nazývá se prosthetická skupina. Jindy je kofaktor s bílkovinnou složkou vázán je slabě a může se od ní lehce oddělovat. Takový kofaktor se nazývá koenzym. Celý komplex bílkovinné složky, nazvané apoenzym, a kofaktoru se pak označuje jako holoenzym [2].

Struktura kofaktorů byla objasněna mnohem dříve než struktura bílkovinné části enzymů. Jde o látky různé chemické povahy, jejich molekuly však většinou obsahují

heterocyklus. Heterocyklus tvoří buď reaktivní část kofaktoru, nebo má funkci rozpoznávacího prvku pro makromolekulu. Pro třídění kofaktorů je praktičtější hledisko funkční než hledisko chemické struktury. Mnohé z kofaktorů mají úzký vztah k vitamínům rozpustným ve vodě a většinou obsahují jako podstatnou složku zbytek kyselin fosforečných, často vázaný v nukleotidu. Vznikem fosforečného esteru se zvyšuje obsah energie molekuly kofaktoru.

Při studiu struktury, bylo potvrzeno, že reakce probíhá v relativně malé oblasti enzymové molekuly, které se říká **aktivní centrum** nebo aktivní místo, *obr. 14*. Aktivní místo je prostorově vymezená malá oblast molekuly, obsahující určité, přesně rozmístěné funkční skupiny [2]. Tyto skupiny jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které bývají v polypeptidovém řetězci vestaveny na různých i dosti vzdálených místech. Svinutím hlavního polypeptidického řetězce do osobité struktury se však dostávají do bezprostřední blízkosti.

Na výstavbě aktivních center enzymů se pravidelně zúčastňuje několik typů skupin. Jsou to především málo početné katalyticky aktivní skupiny tvořící katalytické centrum. Důležité jsou skupiny vázající substrát, označované jako vazné centrum. Nalézají se zde i řada skupin, které vytváří vhodné chemické prostředí v centru nebo které formují vhodnou prostorovou strukturu, nazývané stabilizační nebo aktivační místo.



Obr. 14 Schéma prostorového zformování molekuly enzymu

U enzymů povahy složených bílkovin, jejichž nebílkovinnou část tvoří vázaný koenzym, má aktivní centrum ještě druhou vaznou oblast. Ta zajišťuje vázání koenzymu. Toto vazebné centrum je většinou na povrchu molekuly enzymu a bývá prostorově lokalizováno v bezprostřední blízkosti vazebného centra pro substrát.

Z hlediska prostorového zformování morfologie aktivního centra molekuly enzymů je nejuznávanější teorií model, tzv. klíče a zámku, kap. 2.2.

Enzymatické reakce jsou v oblasti aktivního centra vesměs asymetrické. Probíhají tak, že připojované struktury se blíží molekule substrátu z jednoho směru a odštěpované části odcházejí z komplexu enzym-substrát v druhém směru. Hovoří se pak o směrovaném enzymatickém komplexu [2].

2.2 Mechanismus účinku enzymů

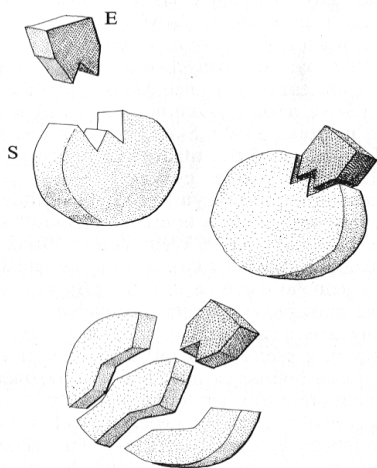
Studiu enzymové katalýzy je věnována velká pozornost. Jsou známy dva typy chemické katalýzy: homogenní a heterogenní. V prvním případě je katalyzátor ve stejné fázi jako substrát, tj. v roztoku. V druhé je katalyzátorem povrch tuhé fáze. Enzymová katalýza leží mezi těmito dvěma extrémy, více se blíží heterogenní katalýze. Enzymová katalýza se však odlišuje od katalýzy chemickými katalyzátory vysokou účinností. Enzymové reakce mají 10^8 až 10^{14} krát vyšší rychlost než reakce nekatalyzované. Rozdíl je též ve specifitě průběhu.

Projevuje se zde **reakční specifita**, tj. specifita k typu katalyzované reakce [2]. Tentýž substrát může být proto přeměňován několika enzymy s různou specifitou účinku na různé produkty.

Vedle specifity k typu reakce jsou enzymy specifické i k přeměňovanému substrátu. Tzv. **substrátová specifita** je zajišťována na třech úrovních [2]. Enzym jako specifický katalyzátor musí nejprve rozpoznat některé obecné strukturní rysy na substrátu. Této úrovni specifity se říká strukturní specifita. Dále katalýza musí probíhat ve specifické oblasti substrátu tj. regiospecifitě. A konečně musí být dodržen stereospecifický průběh katalýzy. Tato třetí úroveň se nazývá stereospecifita.

Bylo prokázáno, že substrátovou specifitu určuje vždy jen bílkovinná část molekuly enzymu. Naproti tomu na účinkové specifitě se u enzymů podílí nejen kofaktor, ale i bílkovinná složka enzymu. Je známá totiž řada případů, kdy se tentýž kofaktor účastní zcela odlišných reakcí podle své vázané bílkovinné složky.

Pro objasnění mechanismu interakce enzymu a substrátu bylo vysloveno několik teorií [2], vysvětlující pouze odděleně dílčí vlastnosti enzymové katalýzy. Nejdříve to byla teorie komplementarity a druhým významným názorem byla teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové.



Obr. 15 Schéma teorie zámku a klíče
S – substrát, E – enzym

1. Teorie komplementarity nazývaná též teorie „klíče“ (substrát) a „zámku“ (enzym), obr. 15, byla formulována organickým chemikem E. Fisherem už v roce 1894. Její podstatou je, že účinná je pouze omezená oblast molekuly enzymu, která umožňuje kontakt pouze se substrátem vhodné geometrické struktury. Tato teorie uspokojivě vysvětlila mnohá data související se specifitou enzymu. Byla později opakovaně experimentálně ověřena a stala se výchozím bodem dalších teorií o úloze konformace enzymů v jejich katalytické funkci.

2. Druhou významnou teorií byla teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové vycházející z představy V. Henriho z roku 1902. Jejím základem je předpoklad, že molekuly enzymů váží substrát za tvorby meziproduktu podle zákona o chemické rovnováze. Tato teorie vytvořila základ ke kvantitativnímu popisu účinku enzymů, a umožnila tak zpracování kinetiky enzymatických reakcí ještě před odhalením bílkovinné povahy enzymů.

Nový přesnější pohled na tuto problematiku, přineslo až podrobné prozkoumání dynamického charakteru prostorové struktury bílkovin. Konformační změny, pozorované při účinku různých enzymů, nabízí několik možností vysvětlení mechanismu vzniku komplexu enzymu se specifickým substrátem [2].

- Při interakci se konformace nemění. Nejjednodušší způsob zajištění specifity je vzájemné vyhledávání dvou strukturně si odpovídajících rigidních struktur, tj. nejstarší teorie komplementarity.
- Dochází k malým změnám konformace. Jedná se o adjustaci dvou relativně mobilních struktur, označované jako teorie indukovaného přizpůsobení.

- c) Nastávají rozsáhlé změny. Je to případ, kdy se přeuspořádají nejen postraní řetězce, ale i páteř molekuly enzymu. Odhalí se tak skupiny, které byly předtím umístěny uvnitř.

Příčinu schopnosti enzymů enormně zvyšovat rychlost chemických reakcí je třeba hledat ve vzájemném uplatnění řady faktorů, které vyplývají z osobité struktury jejich molekul. Ne všechny lze však postihnout strukturním přístupem. K odhalení mnohých z nich je nutné paralelní studium energetické stránky enzymové katalýzy a podmínek reakce.

2.3 Vliv reakčních podmínek na účinnost enzymů

Enzymatická kinetika se zabývá studiem časového průběhu enzymatických reakcí za různých podmínek a poskytuje tak mnoho cenných informací o účinnosti enzymů.

Enzymově katalyzované reakce probíhají různou rychlostí v závislosti na:

- 1) koncentraci substrátu
- 2) množství enzymu
- 3) fyzikálně chemických vlastnostech prostředí
- 4) přítomnosti efektorů (modifikátorů)

Při nejjednodušších enzymatických reakcích je přeměňován jediný substrát za vzniku jediného produktu. Takových reakcí je poměrně málo. Hydrolytických reakcí se sice účastní dva reaktanty, ale druhým je voda. Její koncentrace se při enzymatickém ději nemění, proto ji obvykle neuvažujeme jako substrát a reakce označujeme jako jednosubstrátové.

Nejčastější jsou však reakce dvousubstrátové, při nichž enzym katalyzuje přeměnu dvou substrátů obvykle na dva produkty.

Existují samozřejmě i reakce třísubstrátové, výjimečně i vícesubstrátové. Slučují se dva substráty na jeden produkt a současně se třetí substrát štěpí na dva produkty.

2.3.1 Vliv koncentrace substrátu a enzymu

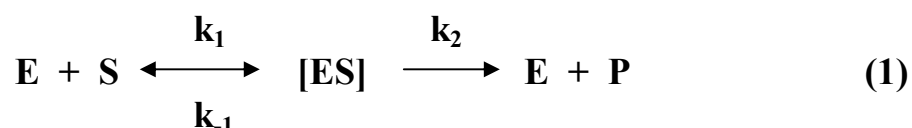
Při prvních kinetických měření prováděných A. Brownem (1902) a později i L. Michaelisem a M. L. Mentenovou (1913) byly odhaleny dvě významné skutečnosti o povaze enzymových reakcí [2].

Jestliže je počáteční koncentrace substrátu udržována konstantní a je měněno množství enzymu, pak závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci enzymu je lineární. Druhé tvrzení pak při konstantní koncentraci enzymu a změně množství substrátu říká, že závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu je hyperbolická, *obr. 16*.

Tato tvrzení mají obecnou platnost pro enzymatické reakce, při kterých se účastní jediný substrát a je přeměňován na jediný reakční produkt.

Rovnice Michaelise a Mentenové

Aby bylo vysvětleno pozorované kinetické chování navrhli L. Michaelis a M. L. Mentenová pro mechanismus jednosubstrátové enzymatické reakce jednoduché obecné schéma:



Toto schéma vychází z představy, že meziproduktem reakce je komplex enzym-substrát [ES]. Ten se pak rozpadá na enzym (E) a produkt (P). Schéma se omezuje na počáteční periodu reakce, kdy koncentrace produktu v reakční směsi a tedy i zpětná tvorba komplexu [ES] z produktu je zanedbatelná.

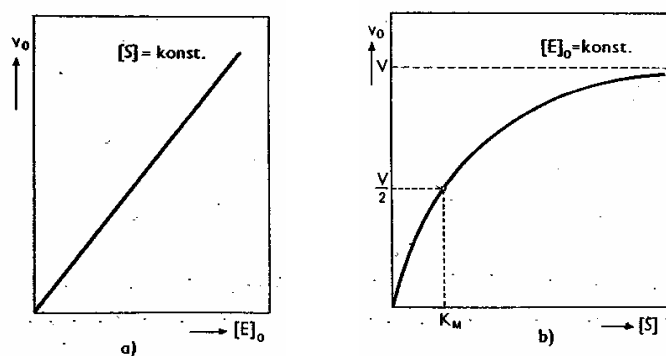
Křivka závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu tedy vyjadřuje podle teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové sycení enzymu substrátem. Nazývána je též jako **saturační křivka**, *obr. 16*. Závislost počáteční rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu [S] vede k výrazu

$$v = \frac{V[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

Tato rovnice se v enzymologii nazývá rovnicí Michaelise a Mentenové. Obsahuje dva parametry: mezní (limitní) rychlost V a tzv. Michaelisovu konstantu K_M . Michaelisova konstanta K_M je rovna koncentraci substrátu, při které je dosaženo poloviny mezní rychlosti. Konstanta K_M má proto rozměr koncentrace. Hodnota K_M rozděluje křivku závislosti počáteční rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu na dvě oblasti.

Při nízkých koncentracích substrátu bude časový průběh enzymatické reakce vystižen kinetickou rovnicí pro 1. řád, při vysokých koncentracích je reakční rychlost konstantní, nezávislá na koncentraci substrátu. Množství vznikajících produktů se proto při dostatečně vysoké koncentraci substrátu mění s časem lineárně a směrnice této přímky je ekvivalentní koncentraci enzymu, resp. jeho aktivitě. Této skutečnosti se využívá ke (kinetickému) určování množství enzymu.

Michaelisova konstanta K_M je nezávislá na koncentraci enzymu, ale závisí na prostředí jako je pH, teplota, přítomnost efektorů apod. Nezbytné je proto uvedení údaje o podmínkách, za kterých byla stanovena. Hodnoty Michaelisovy konstanty K_M se pohybují v širokém rozmezí, pro většinu enzymů 10^{-1} až 10^{-6} mol.dm⁻³. Čím je hodnota Michaelisovy konstanty nižší, je afinita enzymu k danému substrátu vyšší. Jestliže enzym působí na více substrátů, pak za hlavní se považuje ten, pro který má enzym nejnížší K_M . Podle hodnoty Michaelisovy konstanty K_M se může vypočítat počáteční rychlost enzymatické reakce pro danou koncentraci substrátu nebo naopak koncentrace substrátu nutná k dosažení požadované rychlosti.



Obr. 16 a) Závislost počáteční rychlosti v_0 enzymatické reakce na koncentraci enzymu, $[E]_0$, při konstantní koncentraci substrátu $[S]$
 b) Závislost počáteční rychlosti v_0 na koncentraci substrátu $[S]$, při konstantní koncentraci enzymu $[E]_0$. Symbol V značí mezní rychlost a K_M Michaelisovu konstantu.

Rovnice Michaelise a Mentenové má několik vážných nedostatků. Mezi nevýhody rovnice patří, že zahrnuje pouze jednosubstrátové reakce a zabývá se jen počátečními rychlostmi reakcí. Podle nových studií bylo dokázáno, že i představa rozpadu komplexu enzym-substrát přímo na produkt a enzym je mylná. Přeměna je ve skutečnosti vícestupňovým dějem, při kterém krátce existuje několik komplexních meziproduktů. Přes uvedené nedostatky je však rovnice Michaelise a Mentenové nejpoužívanějším kinetickým vztahem v enzymologii.

Kinetika více substrátových reakcí

Při látkové přeměně organismů je častější, že enzym přeměňuje dva substráty na dva produkty. Reakce mohou probíhat odlišnými mechanismy [2]. U některých je nutné, aby se na enzym navázaly oba substráty dříve, než se odštěpí první produkt. Enzym naváže první substrát, který umožní změnou konformace vazbu druhého substrátu. Pak se z komplexu oddělí postupně oba produkty. Tento mechanismus se nazývá následný uspořádaný.

Jestliže nezáleží na sledu vazby substrátů na enzym a na pořadí uvolňování produktů, pak enzymatická reakce probíhá následným náhodným mechanismem. Dochází k němu, má-li volný enzym přibližně stejnou afinitu k oběma substrátům.

Třetí běžný typ průběhu dvou substrátových reakcí je tzv. mechanismus ping-pongový. Na enzym se připojí první substrát, dojde k reakci a oddělí se první produkt. Enzym se uvolní v pozměněné formě a naváže druhý substrát. Tomuto substrátu předá skupinu, kterou přijal od prvního substrátu. Po proběhnutí druhé reakce se uvolní druhý produkt a enzym se objeví v původní podobě.

Některé enzymy dovedou katalyzovat reakce i mezi třemi, dokonce i více substráty. Jejich mechanismy lze v podstatě odvodit od popsaných mechanismů dvou substrátových přeměn.

2.3.2 Fyzikální vlastnosti prostředí

Neméně důležitou roli při enzymatických reakcích hraje reakční prostředí. Složité struktury enzymů jsou totiž velmi citlivé k řadě faktorům a poměrně rychle se opotřebovávají.

Rychlost enzymových reakcí vzrůstá s rostoucí teplotou. Ovšem při překročení optimální teploty enzymu dochází k jeho inaktivaci v důsledku denaturace jeho bílkovinné části a případně k odštěpování kofaktoru.

Většina enzymů působí katalyticky jen v určité oblasti pH. Mimo ni jejich účinnost značně klesá. Závislost rychlosti enzymové reakce na pH má tvar zvonovité křivky. Jejímu maximu odpovídá optimální pH, při kterém je aktivita enzymu nejvyšší. Většina enzymů má optimum účinnosti při neutrálním až slabě kyselém pH.

Aktivita enzymů může záviset na redoxpotenciálu prostředí nebo relativní permitivitě, která ovlivňuje sílu nekovalentních interakcí při reakci enzymu se substrátem.

V neposlední řadě ovlivňuje katalytickou účinnost enzymů celá řada látek, kterým se říká efektory nebo modifikátory. Zvyšují-li aktivitu pak se nazývají pozitivní efektory (aktivátory), pokud snižují účinek hovoří se o negativních efektorech (inhibitorech). Aktivátory mohou být ionty kovů, organické látky a v některých případech i anionty. Inhibitory jsou jedním z hlavních regulačních prostředků buněčného metabolismu. Vyskytují se ve formě iontů, organických a anorganických látek o nízkomolekulární i vysokomolekulární stupni. Vyvolávají buď změnu molekuly enzymu se ztrátou katalytické účinnosti nebo konkurují substrátu a tím snižují rychlost přeměny. Inhibitory mají nejen regulační funkci v živé buňce, ale jsou účelné i při praktickém využití, např. při diagnostických metodách v enzymologii, v zemědělství a široké uplatnění našly v lékařství.

2.4 Klasifikace a názvosloví enzymů

V prvních dobách studia byly enzymům dávány celkem náhodné triviální názvy, většinou s koncovnou –in. Některé z nich používáme dodnes. Později byla pro enzymy zvolena koncovka –asa. Název byl tvořen podle substrátu, který enzym katalyzoval nebo podle charakteru katalyzované reakce. Enzymová komise Mezinárodní unie biochemie (IUB) proto v roce 1961 vedle doporučených názvů zavedla systémové rozdělení a z něho vyplývající systémové názvy. Podle nomenklatury bylo vytvořeno i české názvosloví enzymů. Snaží se o co největší podobnost s názvoslovím mezinárodním. Je zachována koncovka –asa a většinou se píše jako jedno slovo.

Základem jednotné klasifikace a nomenklatury enzymů je jejich rozdělení do šesti hlavních tříd podle typu katalyzované reakce [2]:

1. **Oxidoreduktasy**, jedna z nejpočetnějších tříd enzymů, katalyzují intermolekulární oxidačně-redukční přeměny.
2. **Transferasy** uskutečňují přenos skupin z jejich donoru na akceptor.
3. **Hydrolazy** štěpí vazby, které vznikly kondenzací za odštěpení vody. Je to početná skupina enzymů povahy jednoduchých bílkovin. Dělíme je na skupinu proteas (štěpí peptidové vazby v molekulách bílkovin a peptidů), glykosidas (štěpí glykosidové vazby), lipas (štěpí esterové vazby lipidů) apod.
4. **Lyasy** katalyzují nehydrolytické štěpení vazeb C-C, C-O, C-N apod. Odštěpují při tom ze substrátu malé molekuly bez pomoci dalšího reaktantu. Při štěpení substrátu dochází k eliminaci malé molekuly za vzniku dvojné vazby, v opačném směru reakce dochází k adici na dvojnou vazbu. Tyto enzymy tvoří malou skupinu enzymů, většinou jsou povahy složených bílkovin.
5. **Izomerazy** realizují vnitromolekulové přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny izomerů.
6. **Ligasy** katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky uvolňující energii.

2.5 Přehled použitých enzymů

V této práci se použily především enzymy ze třídy hydrolas a lyas. Hydrolasy jsou enzymy, které hydrolyticky štěpí vazby, které vznikly kondenzační reakcí. Dále se dělí na podtřídy podle typu štěpených vazeb, např. na proteolytické a glykosidasové enzymy, esterasy atd. Lyasy katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N atd., pokud to není energeticky náročné. Provádějí to většinou tak, že odštěpují ze substrátu nebo do něj vnášejí malé molekuly (např. H_2O , CO_2 , NH_3 atd.) bez pomoci dalšího reaktantu.

Pozornost se zaměřila na enzymy, které nejvíce odpovídají potřebám totální enzymatické degradace přírodních vláken, a to jsou enzymy přerušující glykosidické, peptidové a esterové vazby.

2.5.1 Proteolytické enzymy

Pro přerušení polypeptidických vazeb v živočišných vláknech se uplatnily proteolytické enzymy (peptidasy).

Proteolytické enzymy jsou přítomné prakticky ve všech živých buňkách. Jejich společným rysem je právě schopnost hydrolyzovat peptidové vazby v bílkovinných substrátech. Celá řada z nich vykazuje další aktivity jako esterovou, koagulační, transpeptidasovou. Všeobecně jsou známy jejich různé regulační funkce při metabolismu vyšších organismů, např. limitovaná proteolýza, účast při srážení krve nebo aktivace trávicích enzymů.

Klasifikace

Názvoslovný výbor Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (IUBMB) navrhl v roce 1992 používat pro proteolytické enzymy jednotný všeobecný název **peptidasy**. Je to synonymum v minulosti používaného výrazu proteasa. Podle této nomenklatury se peptidasy rozdělují na dvě podtřídy na exopeptidasy (EC 3.4.11 – 19) a endopeptidasy (EC 3.4.21 – 24 a EC 3.4.99) [22].

Exopeptidasy atakují peptidové vazby pouze na koncích polypeptidových řetězců. Přitom aminopeptidasy (EC 3.4.11) odštěpují volné aminokyseliny z N-konce polypeptidového řetězce proteinu a dipeptidyl-peptidasy či tripeptidyl-peptidasy (EC 3.4.14) uvolňují příslušné dipeptidy či tripeptidy. Exopeptidasy mohou také odštěpovat koncové aminokyseliny z C-konce polypeptidového řetězce proteinu. Mezi ně se zařazují karboxypeptidasy (EC 3.4.16 – 18) a peptidyl-dipeptidasy (EC 3.4.15). Karboxypeptidasy se dále rozdělují podle struktury katalytického místa na karboxypeptidasy serinového typu (EC 3.4.16), metalokarboxypeptidasy (EC 3.4.17) a karboxypeptidasy cysteinového typu (EC 3.4.18). Jiné exopeptidasy jsou specifické pro odštěpování dipeptidů, tzv. dipeptidasy (EC 3.4.13) nebo odštěpují substituované, cyklizované nebo izopeptidové vazby spojené zbytky, tzv. omega-peptidasy (EC 3.4.19)

Endopeptidasy se podle struktury katalytického místa rozdělují na endopeptidasy serinové (EC 3.4.21), cysteinové (EC 3.4.22), aspartátové (EC 3.4.23), metaloendopeptidasy (EC 3.4.24), treoninové (EC 3.4.25) a jiné endopeptidasy (EC 3.4.99). Endopeptidasy dokáží katalyzovat štěpení uvnitř i na koncích polypeptidového řetězce proteinu [22].

Specifita peptidas nezávisí na délce řetězce, ale na povaze aminokyselin a na přítomnosti nebo nepřítomnosti blízkých nabitých skupin. Peptidasy můžeme klasifikovat též na základě dalších kritérií, a to podle původu (rostlinné, živočišné, mikrobiální), podle jejich lokalizace (intracelulární, extracelulární), podle optimálního pH (kyselé, neutrální, alkalické) atd.

Podle mechanismu katalýzy se proteolytické enzymy klasifikují do pěti skupin, zahrnující serinové, cysteinové, aspartátové, metalopeptidasy a zatím nespecifikované proteasy [22].

Serinové peptidasy

Největší skupinu proteolytických enzymů mikrobiálního a živočišného původu tvoří serinové peptidasy. Součástí jejich katalytického místa je reaktivní serinový zbytek. Významným krokem tohoto mechanismu je tvorba esteru mezi kyslíkem serinu a acylovým zbytkem substrátu za vzniku aminového zbytku jako prvního produktu. Dalším důležitým prvkem katalýzy štěpení peptidových vazeb serinových peptidas je přítomnost dvou hlavních řetězců se skupinami $-NH-$, které se podílejí na tvorbě vodíkových vazeb s kyslíkovým atomem karbonylové skupiny, která je součástí štěpené peptidové vazby. Nezbytným je však také jeden histidyl a jeden aspartyl. Tyto tři zbytky se nalézají ve vzdálených místech polypeptidového řetězce enzymu, jsou velmi přesně prostorově rozloženy, což jim umožňuje dobře vzájemně kooperovat. Celá katalytická triáda se pak nazývá nábojová (protonová) štafeta [23].

Z důvodu strukturní i funkční příbuznosti je pro celou skupinu často používaný název trypsinové enzymy nebo enzymová trypsinová rodina. Trypsin (EC 3.4.21.4) je jedním z nejprostudovanějších enzymů díky své relativně jednoduché struktuře a lehké komerční dostupnosti, např. pankreatický trypsin Novo (NovoNordisk A/S) je potravinářsky významný preparát izolovaný z pankreatu prasat s optimální teplotou 45° až 50 °C a pH 7 – 8. V kombinaci s chymotrypsinem se používá na snížení alergenicity bílkovin v potravinářství. V lékařské praxi má významné postavení trombin, který má antitrombotický účinek.

Cysteinové peptidasy

Mechanismus účinku cysteinových peptidas je velmi podobný mechanismu serinových peptidas. Je rovněž založen na vzniku kovalentního meziprojektu s tím rozdílem, že v případě cysteinových peptidas je atakujícím nukleofilním atomem síra postranního řetězce cysteinu. I zde je do procesu zapojen postraní řetězec histidinu, který funguje jako akceptor vodíkového atomu. Pro celou skupinu je charakteristická protonová štafeta katalytické triády cystein, histidin a glycin. Výskyt cysteinových peptidas kromě živočichů a rostlin byl zaznamenán pouze v omezeném množství u plísni [23].

Mezi potravinářsky významné cysteinové peptidasy patří bromelain, ficin a papain. Bromelain je znám svou aplikací při hydrolýze většiny rozpustných proteinů. V procesu výroby piva se uplatňuje papain. Všechny tři peptidasy se používají v masném průmyslu.

Aspartátové peptidasy

Tato skupina peptidas katalyzuje hydrolýzu peptidových vazeb bez nukleofilního ataku funkční skupiny enzymu. Z tohoto důvodu se mezi enzymem a substrátem nevytváří žádný kovalentní meziprojekt. Katalytický aparát aspartátových peptidas se skládá ze dvou postranních řetězců kyseliny asparagové. Katalytický mechanismus zabezpečuje katalytická diáda dvou zbytků kyseliny asparagové, přičemž jeden karboxyl se vyskytuje v ionizované a druhý v protonizované formě. Celá skupina těchto peptidas je charakteristická maximální aktivitou při nízkém pH (3 – 4), někdy jsou označovány jako kyselé proteasy [23].

Mnoho aspartátových peptidas produkovaných plísněmi se využívá hlavně v potravinářství. Mezi farmakologicky nejvýznamnějšími enzymy této skupiny patří virová HIV-proteasa I, HIV-proteasa II a renin.

Metalopeptidasy

Podobně jako aspartátové peptidasy ani metalopeptidasy při štěpení peptidových vazeb nevytváří kovalentní meziprojekt. Jejich katalytický účinek je spojený s koordinací přítomného kovového iontu v enzymu. Tímto kovem je obvykle zinek.

V některých případech může být nahrazen jiným přechodovým kovem. Kovový iont pomáhá při štěpení peptidové vazby za přítomnosti molekuly vody především svým silným elektrofilním charakterem. Katalytický mechanismus využívá iontu zinku koordinovaný třemi zbytky histidinu [23].

Metalopeptidasy produkované bakteriemi a plísněmi nacházejí velké uplatnění v potravinářském průmyslu při úpravě mouky, masa a hydrolýze potravin. Do farmakologicky nejvýznamějších enzymů této skupiny patří matrilysin, kolagenasy [24] a želatinasy různého typu.

Zatím neklasifikované proteasy

Tyto proteasy nemají ještě přesně charakterizovanou strukturu katalytického místa. Příkladem mohou být virové proteasy.

2.5.2 Glykosylasové enzymy

Pro přerušení glykosidických vazeb v rostlinných vláknech bylo použito glykosylasové enzymy (glykosylasy). Glykosylasy se ještě dále dělí na glykosidasy (EC 3.2.1.-), které dokáží účinně hydrolyzovat O- a S-glykosylické vazby, na N-glykosylasové enzymy (EC 3.2.2.-) a na nespecifické glykosylasy (EC 3.2.3.-) [25].

2.5.3 Esterasy

Esterasy jsou hydrolytickými enzymy, které štěpí estery na kyseliny a alkoholy. Tato chemická reakce za přítomnosti vody se nazývá hydrolýza. Existuje široké rozmezí různých esterů, které jsou různorodé v substrátové specifitě, proteinové struktuře a biologické funkci. Mezi esterasy patří např. lipasy štěpící lipidy a tuky na mastné kyseliny a glycerol nebo jiný alkohol, acylesterasy, početná skupina nukleasy, thioesterasy, cholesterol esterasy, leukocyt esterasy aj. [25] Katalytický aparát esterů zahrnuje katalytickou triádu – serin, glutamat nebo aspartat, histidin [26].

2.5.4 Seznam použitých enzymů v práci

Hydrolasy	Esterasy	E 1
	Glykosidasy	G 1
		G 2
		G 3
	Peptidasy	P 1
		P 2
		P 3
		P 4
		P 5
		P 6
		P 7
Lyasy	L 1	

3. BIOTECHNOLOGIE

Již odnepaměti se lidstvo snaží využívat procesy v živé přírodě ke svému prospěchu. Mezi nejstarší empirické využití mikroorganismů patří výroba vína, piva či příprava sýrů a pečiva. Teprve po vzniku biochemie a biologických věd došlo k cílenému využití a exaktnímu popisu těchto dějů. Pro tyto nové aplikace se začalo používat termínu biotechnologie.

Pojem biotechnologie poprvé použil roku 1917 maďarský inženýr Karol Ereky a označil tímto termínem postupy a procesy, které využívaly živé systémy, jako biotransformační prostředky na získání určitého produktu. Toto vymezení biochemii je ovšem velmi volné a nepřesné.

Používání vědeckých metod v biotechnologii je spojováno se jménem francouzského bakteriologa Louise Pasteura, který zavedl používání čistých kultur mikroorganismů v pivovarech a při výrobě vína. Dokázal tak, že mikroorganismy nemohou vzniknout spontánně, ale jejich zárodky se musí do sterilního prostředí zanást náhodně nebo úmyslně [3].

Evropská biotechnologická federace definuje **biotechnologii** jako integrované uplatnění biochemie, mikrobiologie a inženýrských věd umožňující technologické využití schopností mikroorganismů, rostlinných nebo savčích buněk, jejich částí nebo produktů jejich metabolismu. Jde v podstatě o chemické technologie, které využívají vysoce specifické katalyzátory biologické povahy. Biochemický katalyzátor se zúčastní reakce buď jako izolovaný enzym, či jako komplex enzymů vázaných na buňky, v případě biotechnologie se pracuje s živými mikroorganismy nebo jejich částmi. V širším pojetí předmětu biotechnologie najdou místo i procesy týkající se vlastních genových manipulací, tvorba biosenzorů a příprava různých forem enzymových katalyzátorů či přenosu embrií [27].

Hlavní uzly biotechnologií jsou jednotka přípravy suroviny, bioreaktor a separace produktu [27]. Při realizaci biotechnologie je proto možné a nutné využít pro navrhování jednotlivých uzlů známých poznatků a zkušeností z chemického inženýrství, jednotkových operací, transportních jevů, teorie chemických reaktorů, systémového inženýrství, teorie regulace a řízení apod.

3.1 Přednosti a nevýhody

Jako jedna z největších předností biotechnologie se uvádí její surovinná základna. Chemický průmysl je odkázán převážně na fosilní neobnovitelné uhlovodíky získávané především z ropy. Biotechnologie využívají jako výchozí surovinu součásti biomasy, která je nepřetržitě tvořena živými systémy. Hlavní část tvoří sacharidy (celulóza, hemicelulóza, škroby, pektiny), lipidy, bílkoviny, pryskyřice a další látky. Nezanedbatelné nejsou ani živočišné a rostlinné odpady ze zemědělství a průmyslové sféry (melasa, syrovátka), městské odpady a konečně i laciné chemické a petrochemické suroviny (methan, n-alkany, methanol, ethanol, octová kyselina) [28].

Další předností biotechnologií je nižší energetická náročnost. Zatímco chemické výroby vyžadují často vysoké teploty a tlaky, biotechnologické postupy probíhají nejčastěji při teplotách v rozmezí 25° až 35 °C, popř. při 60 °C.

Bohužel energickou výhodnost nemají všechny biotechnologické postupy. Velké nároky na teplo vyžadují procesy, kde je nutné aseptické prostředí získávané sterilací teplem kultivačního media, nebo při postupech vyžadující zahušťování zředěných roztoků meziproduktů či produktů [28].

Vedle nesporných předností má biotechnologie i některé nevýhody a úskalí. Biotechnologie, jako „mladá“ vědní disciplína, vyžaduje vysoké náklady na výzkum a vývoj, organizační práce a investice. Je udávána malá efektivnost oproti klasickým metodám, u nichž se pozitivně projevily dlouhodobě nízké ceny energie a surovin, a nízká koncentrace látek účastnících se biochemických přeměn. Proto je zde nutno provádět náročné a nákladné zakoncentrování či izolace produktů ze složitých směsí. V neposlední řadě je důležité sledování sociálně-politického a etického dopadu biotechnologií.

3.2 Biotechnologické směry a použití

V současnosti biotechnologie představují jednu z nejvíce rozvíjejících se oblastí teoretického výzkumu s ekonomicky velmi výhodnými možnostmi využití dosažených výsledků ve výrobní či jiné aplikační praxi.

Nejvýznamnějším biotechnologickým směrem je průmyslová **mikrobiologie**, označovaná též jako mikrobiální (fermentační, kvasný) průmysl [28]. Mikroorganismy disponují velice širokou řadou metabolických reakcí a jsou schopni vyrábět pestré

paletu produktů. Významná je výroba potravin a nápojů, výroba mikrobiální biomasy pro krmné účely, produkce pestré škály přírodních látek povahy primárních a sekundárních metabolitů.

Do dalšího směru vývoje patří **enzymové inženýrství**, které se zabývá buněčným a genetickým inženýrstvím a jejich aplikacemi jako jsou buněčné a genové technologie [28]. Nejstaršími pokusy jsou snahy o pěstování živočišných a rostlinných buněk v průmyslovém měřítku jako buňky mikrobiální. Živočišné buňky by se pak daly použít pro potřeby moderní medicíny (různé vakcíny, hormony a terapeutické látky). Pěstování živočišných buněk ve velkém měřítku v umělém prostředí však není jednoduché, na rozdíl od kultivace buňky mikrobiální. Je to dáno výraznou odlišností a složitostí buňky živočišné od buňky mikrobiální. Navržené techniky (perfuzní bioreaktory, trubičkové bioreaktory) nesplňují optimální kultivaci savčích buněk ve velkém měřítku, proto je tato biotechnologie v neustálém výzkumu. Dnešní zařízení se používají zatím k výrobě klasických antivirových vakcín, léčebných látek proti mnoha druhům infekčních onemocnění a výrobě lidských interferonů.

Velké úsilí je taktéž věnováno vypracování biotechnologické výroby rostlinných látek. Některé látky povahy sekundárních metabolitů nelze totiž získat ekonomicky únosnou syntézou. Pro biotechnologické využití fytohmasy přichází v úvahu především produkce různých průmyslově využitelných sloučenin (enzymy, aminokyseliny, sekundární metabolity), biotransformace různých sloučenin na užitečné látky (steroidy) a využití ve šlechtění, množení a ozdravování rostlinných materiálů [28].

Nejdůležitější aplikace biotechnologií jsou dle [28]:

- a) Výroba potravin a nápojů, která reprezentuje více než 75% obratu všech biotechnologických produktů.
- b) Výroba přírodních látek pro použití v chemickém průmyslu (např. ethanol, některé organické kyseliny), farmaceutickém průmyslu (např. antibiotika, terapeuticky účinné látky a diagnostické prostředky) a v dalších odvětvích. Jde o látky, které organickou syntézou nejde vyrobit, nebo jejichž výroba je neekonomická a v nedostatečné kvalitě.
- c) Zuzitkování biologických odpadů, umožňující produkci energie z plyných a kapalných biopaliv, získaných z odpadů a fytohmasy.
- d) Čištění životního prostředí, zahrnující objemově snad největší možnost využití biotechnologických metod. Patří sem zpracování odpadní biomasy ze

zemědělství, při výrobě potravin a zpracování dřeva, ale pomáhá řešit i likvidace odpadů městských, petrochemických a slouží k očištění kontaminovaných vod.

3.3 Průmyslová mikrobiologie

Mikroorganismy mají v biotechnologiích přední místo a nacházejí uplatnění jako startovací kultury při výrobě řady potravin a krmných směsí v zemědělství, užívají se pro výrobu průmyslových chemikálií a léčiv, perspektivní je jejich použití pro získávání energie a surovin i při čištění životního prostředí. Při mikrobiální výrobě se sledují dle [29] následující témata:

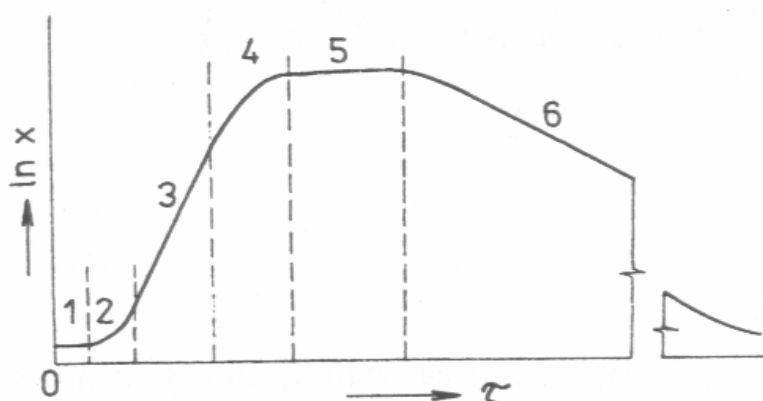
- a) Výběr a úprava vlastností produkčního mikroorganismu pro požadavky technologického postupu
- b) Výběr vhodné suroviny
- c) Optimalizace podmínek růstu produkčního mikroorganismu
- d) Konstrukce vhodného zařízení s regulační technikou k udržení optimálního kultivačního režimu

3.3.1 Růst a množení mikroorganismu

Růst mikroorganismu se definuje jako přírůstek buněčné hmoty provázený syntézou buněčné biomakromolekuly. Buňka postupně zvětšuje svůj objem a po určité době dojde k vegetativnímu rozmnožení, vznikne dělením od mateřské buňky další buňka dceřiná. Za optimálních podmínek se mikroorganismy rozmnožují velkou rychlostí, tato rychlost je omezena množstvím živin a hromaděním produktů metabolismu buněk v prostředí. V příznivých podmínkách se počet buněk zdvojnásobuje v pravidelných intervalech. Generační dobou (dobou zdvojení) se udává doba potřebná ke zdvojení počtu buněk v kultuře. U většiny bakterií je za optimálních podmínek generační doba okolo 20 minut.

V uzavřeném systému vyjadřuje graficky průběh růstu mikroorganismu **růstová křivka** [28]. Průběh růstu se dá rozdělit na několik částí, což je ukázáno na *obr.17* :

1. Přípravná fáze (lag-fáze) je doba mezi inokulací (zaočkování) a dosažením maximální rychlosti dělení buněk. V této fázi nedochází ještě k rozmnožování buněk, ale pouze ke zvětšení objemu a aktivaci enzymových systémů.
2. Fáze zrychleného růstu, kde všechny důležité enzymové reakce dosahují konstantních mezních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.
3. Exponenciální (logaritmická) fáze růstu. Buňky v této fázi mají nejkratší generační dobu, která je po celou tuto fázi konstantní.
4. Fáze zpomaleného růstu, v níž s postupným vyčerpáváním živin a hromaděním toxických metabolitů ztrácí mikroorganismy schopnost se rozmnožovat.
5. Stacionární fáze růstu, dochází k zastavení přírůstku živých buněk.
6. Fáze postupného odumírání buněk, v níž se buňky už nerozmnožují, pouze odumírají a dochází ke snižování počtu buněk.



Obr.17 Růstová křivka

Významné růstové parametry jsou délka lag-fáze, rychlost růstu (resp. generační doba) a výtěžek. Poměr produkované biomasy a množství spotřebovaného substrátu se nazývá koeficient výtěžku.

Popsaná růstová křivka je charakteristická pro kinetiku růstu mikroorganismů v tzv. uzavřených, nebo stacionárních kulturách. Biotechnologie dávají proto přednost tzv. průtokovým neboli kontinuálním metodám. Tyto metody umožňují dlouhodobě udržovat příslušné mikroorganismy v logaritmické fázi růstu. Princip je jednoduchý. Do reaktoru přitéká takové množství příslušného substrátu a živin, jaké je současně ve formě biotechnologického produktu z reaktoru odčerpáváno.

3.3.2 Vliv vnějšího prostředí na růst mikroorganismů

Růst a množení mikroorganismů je do značné míry závislé na podmínkách vnějšího prostředí. V něm musí být nejen dostatečné množství surovin pro syntézu buněčné hmoty a zajištění dostatečného množství využitelné energie, ale pro optimální vývoj mikroorganismu musí prostředí zajišťovat i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky.

Mezi fyzikální faktory ovlivňující životnost mikroorganismů patří teplota a krátkovlnné záření. Teplotní rozmezí, v němž mikroorganismus roste niž by byl poškozován, charakterizují tři základní údaje [29]. Teplota minimální, která udává nejnižší teplotu, při které se daný mikroorganismus ještě rozmnožuje zjistitelnou rychlostí. Teplota optimální (T_{opt}), při které se mikroorganismus rozmnožuje největší rychlostí. Teplota maximální, která udává nejvyšší možnou teplotu, při které je mikroorganismus ještě schopen se rozmnožovat. Podle vztahu k teplotě se mikroorganismy dělí do tří skupin dle [28]:

psychrofilní T_{opt} do 20 °C

mesofilní $T_{\text{opt}} = 25 - 37$ °C

termofilní $T_{\text{opt}} = 60$ °C

Většina bakterií, kvasinek a plísní je mesofilního charakteru.

Smrtící účinky vysokých teplot jsou vyjádřeny letální teplotou, při které je mikroorganismus během určité doby (nejčastěji 10 min) usmrcen.

Na mikrobiální buňku má účinek každé záření, které je buňkou pohlcováno. Letální a mutagenní efekt má především záření o kratších vlnových délkách - ultrafialové záření o vlnové délce 265 nm a záření rentgenové, gama i kosmické o vlnové délce kratší než 10 nm.

Dále se uplatňují i další fyzikální faktory jako je redoxpotenciál, hydrostatický tlak, povrchové napětí, elektrický proud, ultrazvuk a mechanické vlivy.

Růst mikroorganismů je také závislý na dostatečném množství volné vody a je značně citlivý na koncentraci protonů v prostředí. Většina bakterií roste nejlépe v neutrálním nebo mírně kyselém pH, kvasinky vyžadují pH kyselé. Optimální pH pro růst plísní se pohybuje v širokém rozmezí, většinou kolem neutrálního bodu. Kvasinky mají schopnost, do určité míry, si pH prostředí pro svůj růst upravovat samy [28].

Některé látky přítomné v prostředí mají svým chemickým složením na mikroorganismy nepříznivý vliv. Tyto látky se pak označují jako antimikrobiální látky.

Dělí se na mikrobistatické, které pouze zastavují rozmnožování a látky mikroobcidní, které mikroby usmrcují. Antimikrobní účinky mají sloučeniny nejrozumnější chemické struktury, např. antibiotika, antimetabolity, silná oxidační a redukční činidla, tenzidy atd.

V přírodě se ve většině případů vyskytují mikroorganismy ve společenstvech různých druhů. Jejich vzájemné vztahy mají významný vliv na růst a vývoj mikroorganismů. Mohou být pozitivní (syntrofismus, symbiosa, metabiosa), neutrální (komensalismus), ale i záporné (antagonismus, parasitismus) [29].

3.3.3 Kultivace mikroorganismů

Pěstování (kultivaci) mikroorganismů lze provádět dvěma odlišnými způsoby, povrchovou (emersní) a hloubkovou (subemersní) technikou [28].

Při **povrchové kultivaci** se organismy pěstují na povrchu kapalného nebo pevného media. Tato metoda je komplikovaná a pro průmyslové účely málo vhodná.

Při **hloubkové kultivaci** rostou mikroorganismy v kapalném médiu, kde jsou udržovány nejčastěji v homogenní suspenzi mícháním v bioreaktoru. Jestliže v bioreaktoru dochází k aerobnímu procesu, musí se zajistit dostatečné okysličení pomocí intenzivního provzdušňováním stlačeným vzduchem.

Hloubkovou techniku lze realizovat diskontinuálně (vsádkovým způsobem) nebo kontinuálně. Při vsádkovém způsobu se bioreaktor naplní a inokuluje mikrobiální kulturou. Buňky se množí a současně se spotřebovávají živiny v médiu. Po patřičné době se namnožená kultura vypustí a zpracuje. Využívá se pro výrobu látek, které vznikají pouze v určitých fázích růstu (antibiotika, aminokyseliny).

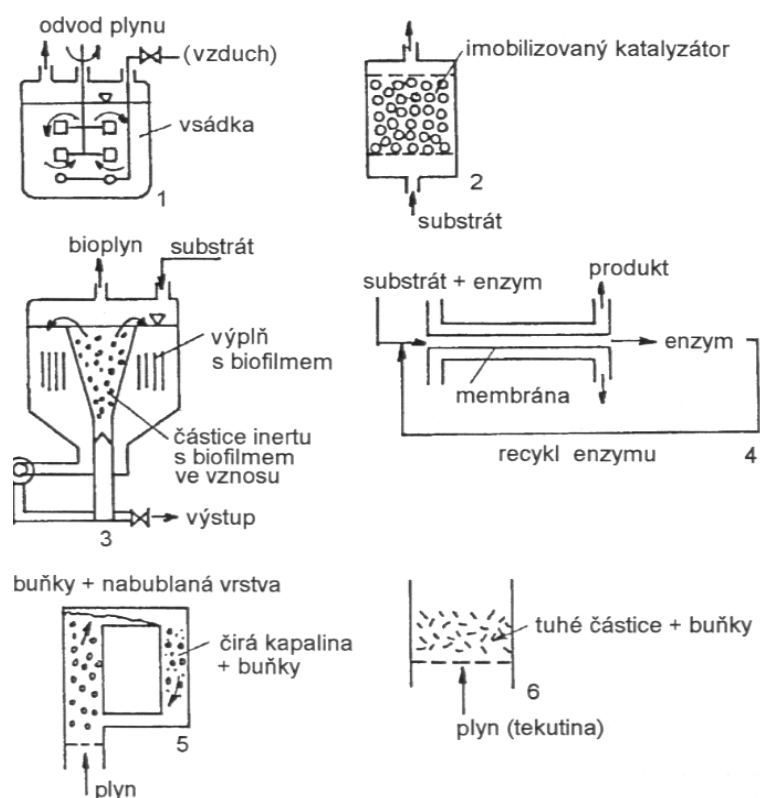
Při kontinuálním způsobu se mikroorganismy plynule doplňují s novým médiem, spojitě se mění na produkt a využitě médium se odstraňuje odtokem. Buňky zde rostou za konstantních podmínek okolí, proto je tato kultivace výhodná pro výroby, kdy žádaným produktem jsou samostatné buňky (krmná biomasa, pekařské droždí).

3.3.4 Bioreaktory

Bioreaktor je jednou z rozhodujících částí biotechnologického procesu. Bioreaktor představuje zařízení, které má umožnit

1. chemickou reakci nebo soubor reakcí katalyzovaných enzymy nebo buňkami produkujícími enzymy
2. kultivaci mikroorganismů, rostlinných nebo živočišných buněk nebo jejich částí za účelem výroby produktů nebo vlastní buněčné hmoty.

Bioreaktory se rozlišují nejčastěji podle způsobu provozu (vsádkové, kontinuální a vsádkové s postupným přidáváním živin – fed-batch), podle počtu stupňů (jednostupňové, vícestupňové), podle konstrukce reaktoru atd. [27] Některé konkrétní druhy jsou schématicky naznačeny na *obr.18*.



Obr.18 Schéma znázornění jednotlivých typů bioreaktorů 1 – mechanicky míchaný fermentor, 2 – průtočný reaktor, 3 – kombinovaný reaktor pro výrobu bioplynu, 4 – enzymový reaktor membránový, 5 – aerobní fermentor s přirozenou cirkulací, 6 – fermentace v tuhém stavu

Protože je fermentace vlastně monoseptická kultivace mikroorganismu v reaktoru, je nutné sterilizovat všechny vstupy a následně i výstupy bioreaktoru. Sterilizací se rozumí usmrcování všech nežádoucích mikroorganismů, které se mohou v příznivých podmínkách kultivace množit na úkor produkčních populací. Sterilizace se provádí fyzikálními i chemickými způsoby (termicky, UV-zářením, filtrací) [30].

3.4 Zpracování biomasy na ethanol

Odpadní zemědělská biomasa, která je častou výchozí surovinou pro biotechnologie, umožnila vytvořit řadu perspektivních biotechnologických postupů, mezi než se řadí výroba technického ethanolu z odpadních zemědělských produktů. Současná výroba bioethanolu ve světě je odhadována na 500 mil tun za rok [31]. Tento bioethanol se může použít jako složka motorových benzínů nebo jako chemická surovina, která dokáže nahrazovat produkty běžně vyráběné z ropy.

Hlavní surovinou pro výrobu je kukuřičná nebo pšeničná biomasa. Tato biomasa se nejdříve musí předzpracovat fyzikálně mletím, pak se z biomasy získávají jednotlivé cukry (sacharifikace) chemickou nebo enzymatickou cestou a nakonec se provádí fermentace na ethanol. Jednotlivé kroky postupu jsou neustále předmětem výzkumu a efektivního zlepšování [32, 33].

Produktem fermentace se získá asi 10% roztok ethanolu, velké množství provozní vody se tedy účinně recykluje pomocí membránových technologií. Při recyklaci tepla se výhodně uplatňuje řešení instalací výměníků sítí. Ani bilance oxidu uhličitého při spalování není nepříznivá. Uhlík v bioethanolu totiž pochází z atmosférického oxidu uhličitého, který byl zachycen během růstu rostliny. Po spálení se tedy do atmosféry pouze opět vrací. Protože na tuto výrobu se začíná nahlížet jako na velkokapacitní, je nutné uvažovat i nad využitím jednotlivých výstupních produktů. Produkovaná biomasa kvasinek fermentace se může zpracovávat na krmné droždí nebo na další krmné směsi [31].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Enzymatická degradace textilního materiálu

Cílem této diplomové práce bylo vytipování vhodných enzymů pro efektivní degradaci textilního materiálu v odpadovém hospodářství. Složení a struktura textilních vláken je ale značně komplikovaná, proto je nutné sestavovat hydrolytické enzymatické kaskády. Teprve při aplikaci těchto stupňovitých kaskád se stává biodegradace účinnou. Tato problematika je tedy dosti obsáhlá, proto byla práce rozdělena na několik částí:

- Výběr a předúprava textilních materiálů
- Výběr vhodných enzymů pro hydrolýzu
- Stanovení hmotnostních úbytků materiálu po enzymatické hydrolýze jednotlivými enzymy
- Sestavení enzymatických kaskád
- Stanovení hmotnostních úbytků materiálu enzymatickými kaskádami
- Chromatografické testování hydrolytických štěpů
- Možnosti využití zbylých hydrolyzátů
- Vliv barvení textilního materiálu na enzymatickou digesti

4.1 Výběr a předúprava textilních materiálů

Protože je práce zaměřena na recyklaci textilií, k experimentům byly použity běžně dostupné materiály, se zaměřením na přírodní typy vláken tj. vlněná, bavlněná, lněná a konopná vlákna. Pro porovnání se pokusy prováděly i s chemickým syntetickým materiálem tj. polyesterem a jako představitel chemického vlákna z přírodních polymerů byla vybrána viskóza. Pokusy byly prováděny s nebarveným materiálem. Vzorky materiálů byly ve formě tkaniny, což modeluje právě podobu textilního odpadu (obnošené šatstvo).

Aby se z materiálu odstranily všechny pomocné textilní přípravky z výroby textilie, byl testovaný materiál nejprve zpracován v lázni 1 : 20 o složení 4 g/l anionického tenzidu. Následoval důkladný oplach teplou a studenou vodou. Po té byl

materiál ještě vyprán v automatické pračce. Pro dokonalý oplach byly následně zařazeny tři máchací cykly v automatické pračce.

4.2 Výběr vhodných enzymů pro hydrolýzu

Enzymy byly vybírány podle vhodných hydrolytických vlastností, podle ekonomického hlediska i možnosti dostupnosti.

4.3 Stanovení hmotnostních úbytků materiálu enzymatickou hydrolýzou jednotlivými enzymy

Vybrané vzorky o hmotnosti cca 0,5 g (cca 10 x 20 mm) se před enzymatickou digescí nechaly odležet 20 hod při teplotě 30 °C. Poté se aklimatizovaly při laboratorní teplotě 10 minut a následně přesně zvažily.

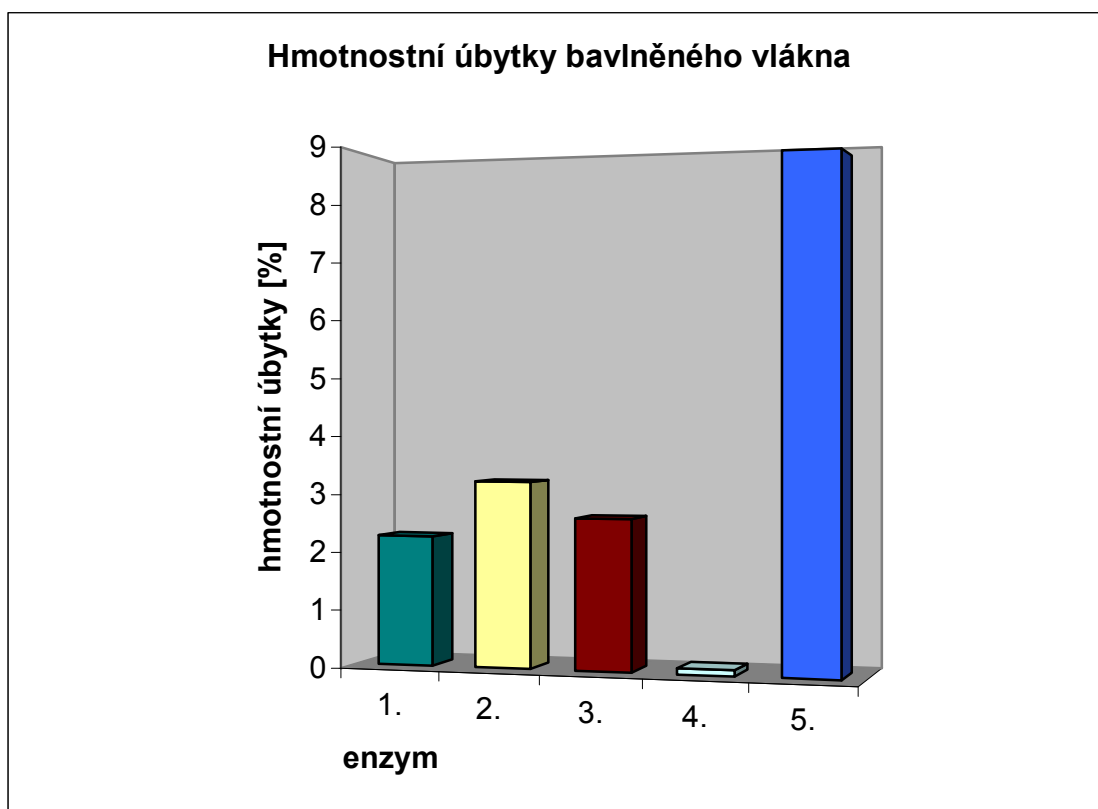
Vzorky byly následně podrobeny enzymatické digesci. Podmínky digesce se variabilně měnily podle účelu příslušného pokusu. U všech enzymů bylo použito prostředí pufru. Pro rovnoměrné působení enzymu na vzorek se provádělo pravidelné míchání. Po digesci se vzorky a z nich uvolněná vlákna vyjmuly, důkladně propláchly v pufru a nakonec v destilované vodě. Hydrolyzáty byly uchovány v zamraženém stavu k dalšímu zpracování (chromatografie).

Vzorky byly usušeny v termostatu. Pak se opět nechaly aklimatizovat 10 minut při laboratorní teplotě a přesně zvažily.

Byly vypočítány hmotnostní úbytky, vyjádřené v procentech k původní hmotnosti vzorku, a které jsou uvedeny níže v **Tab. 1. – 6.**

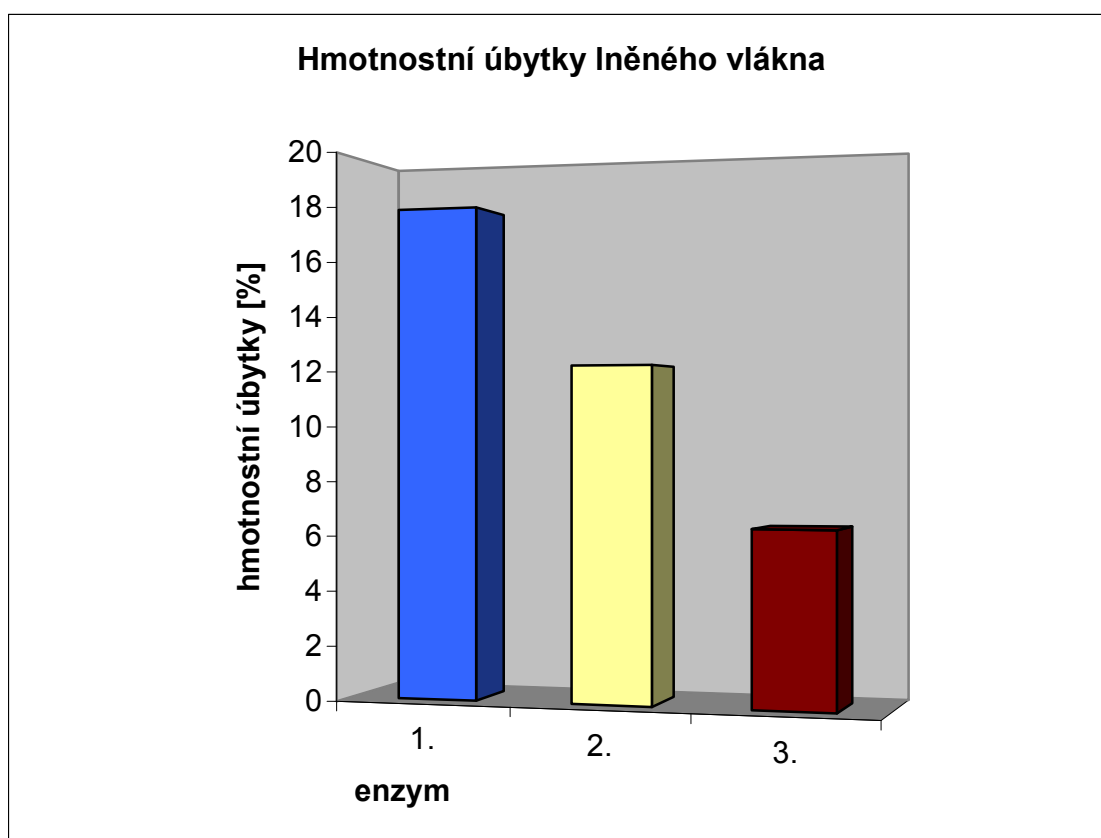
Tab. 1 Tabulka a graf hmotnostních úbytků:**BAVLNĚNÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotností úbytek [%]
1.	G 2	2,26
2.	G 3	3,22
3.	E 1	2,61
4.	G 1	0,10
5.	L 1	8,78



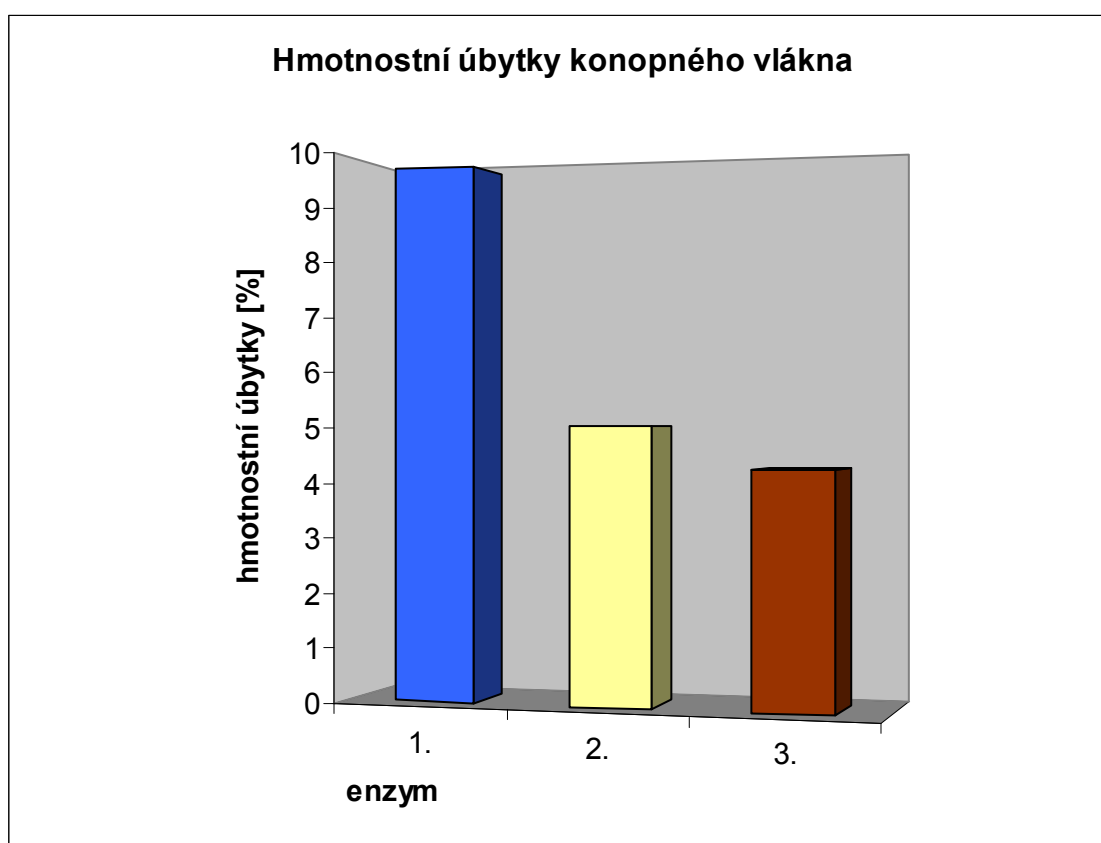
Tab. 2 Tabulka a graf hmotnostních úbytků:**LNĚNÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotnostní úbytek [%]
1.	G 2	18,01
2.	G 3	12,22
3.	G 1	6,38



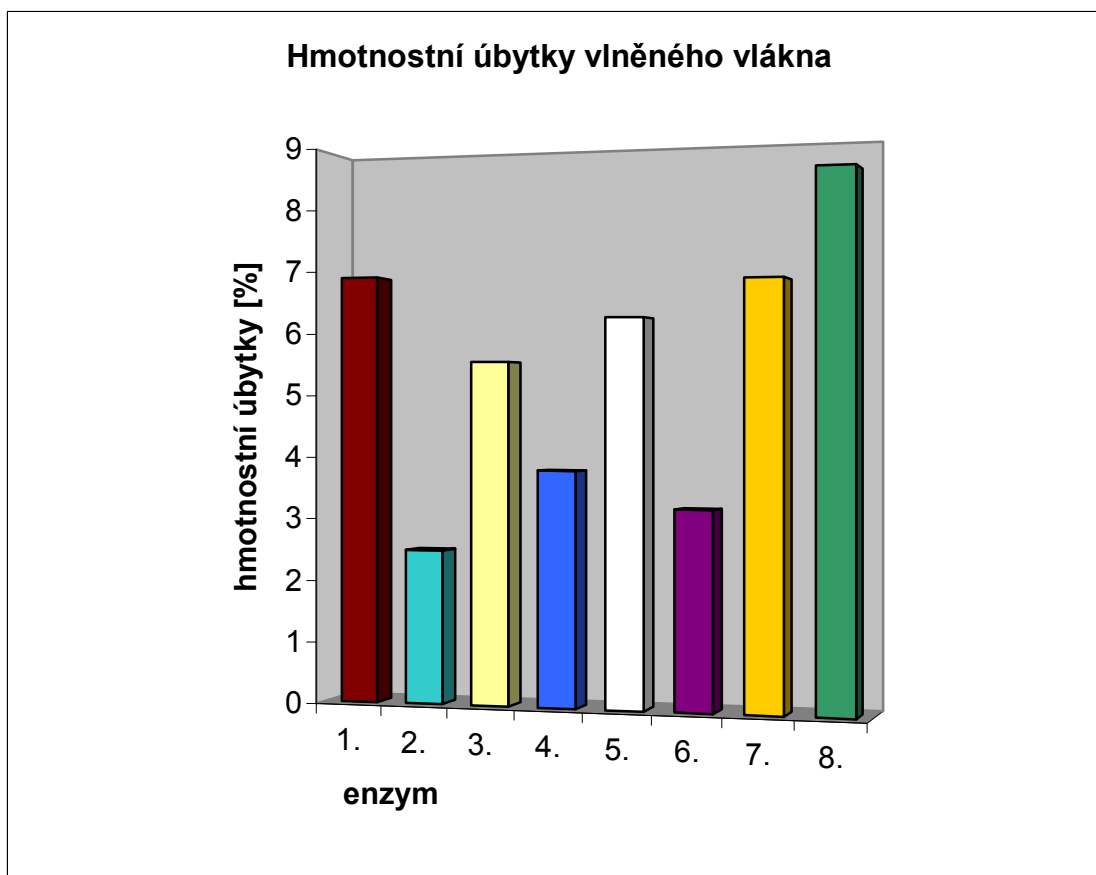
Tab. 3 Tabulka a graf hmotnostních úbytků:**KONOPNÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotností úbytek [%]
1.	G 2	9,77
2.	G 3	5,04
3.	G 1	4,27



Tab. 4 Tabulka a graf hmotnostních úbytků:**VLNĚNÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotností úbytek [%]
1.	P 2	6,93
2.	P 1	2,49
3.	P 7	5,54
4.	P 4	3,79
5.	P 6	6,23
6.	E 1	3,19
7.	P 5	6,82
8.	P 3	8,53

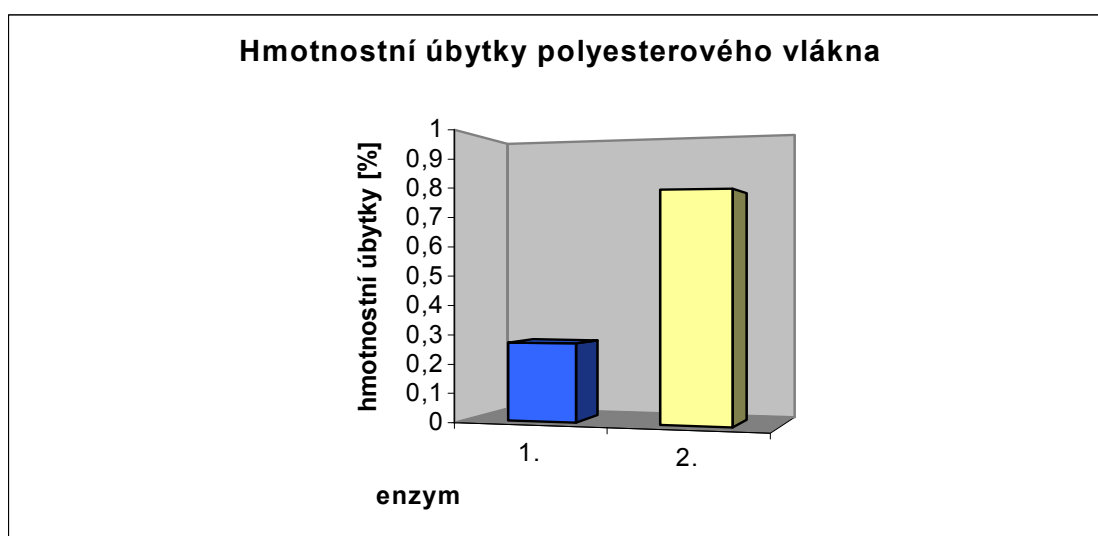


Tab. 5 Tabulka hmotnostních úbytků:**VISKÓZOVÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotnostní úbytek [%]
1.	G 3	18,1

Tab. 6 Tabulka a graf hmotnostních úbytků:**POLYESTEROVÉ VZORKY**

vzorek	enzym	hmotnostní úbytek [%]
1.	E 1 - min	0,27
2.	E 1 - hod	0,79



4.4 Sestavení enzymatických kaskád

Textilní vlákna jsou strukturně velmi složitá, jednotlivé vrstvy vlákna se od sebe liší nejen svou funkcí, ale i chemickým složením. Při enzymatické degradaci je tedy nutné cíleně kombinovat enzymy, aby postupně působily na jednotlivé vrstvy a účinně je štěpily. Při výběru vhodných enzymů byly sledovány tzv. substrátové specifity enzymů. Teprve vhodnou kombinací se dosáhne požadovaného synergického efektu.

Na základě výsledků hmotnostních úbytků po enzymatické digesci, viz kap. 4.3, byly vytipovány vhodné kombinace zkoumaných enzymů (enzymové kaskády), které by daný materiál měly ještě účinněji degradovat.

4.5 Stanovení hmotnostních úbytků enzymatickými kaskádami

Pro hodnocení vhodnosti kombinace enzymů se opět používala metoda stanovení hmotnostních úbytků příslušného textilního materiálu.

Pracovní postup i podmínky digesce při kombinaci dvou enzymů, tzn. enzymatické kaskády, a zjištění hmotnostního úbytku byl totožný jako při práci s jednotlivými enzymy, který je popsán v kap. 4.3. Digestce enzymatické kaskády se realizovala dvojím způsobem. Nejdříve se digestce prováděla v jednom samostatném roztoku enzymu a následně pak samostatně v druhém roztoku enzymu do kombinace. Tento postup je v **Tab. 7 – 10.** označen jako „postupně“. U lněných a bavlněných vláken se kombinace dvou enzymů prováděla i dohromady, tj. zpracováním materiálu ve společném roztoku dvou enzymů. Tento postup je označen v **Tab. 7 – 10.** jako „dohromady“.

U lněného materiálu 4. vzorku byl materiál zpracován po 1/3 celkové doby pouze v samotném roztoku prvního enzymu, druhý enzym do kombinace byl přidán až po této době a následovala společná digestce.

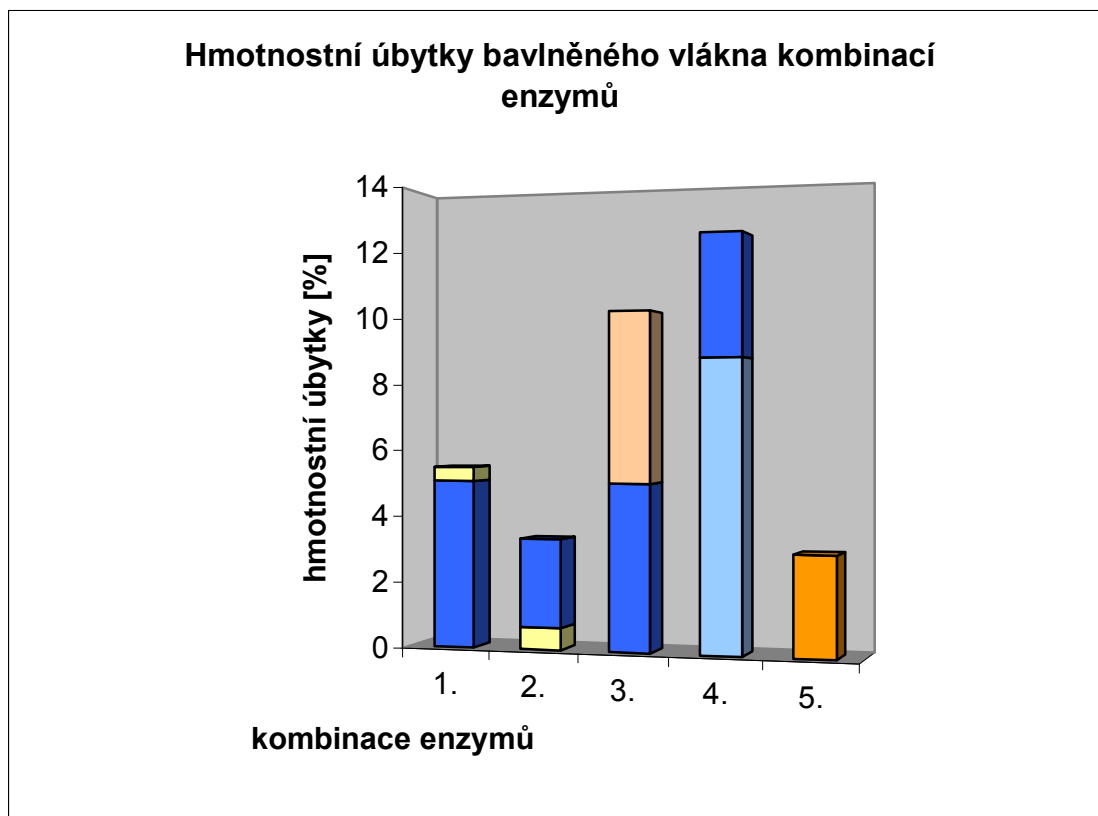
Tab. 7 Tabulka a graf hmotnostních úbytků kombinací enzymů:**BAVLNĚNÉ VZORKY**

POSTUPNĚ:

vzorek	enzym - vlastní kombinace	1. hmotností úbytek [%]	2. hmotností úbytek [%]	celkový hmotností úbytek [%]
1.	G 2 + G 3	5,06	0,43	5,49
2.	G 3 + G 2	0,66	2,67	3,33
3.	G 2 + G 1	5,02	5,17	10,19
4.	L 1 + G 2	8,78	3,69	12,47

DOHROMADY:

vzorek	enzym - vlastní kombinace	celkový hmotností úbytek [%]
5.	L 1 + G 2	3,02



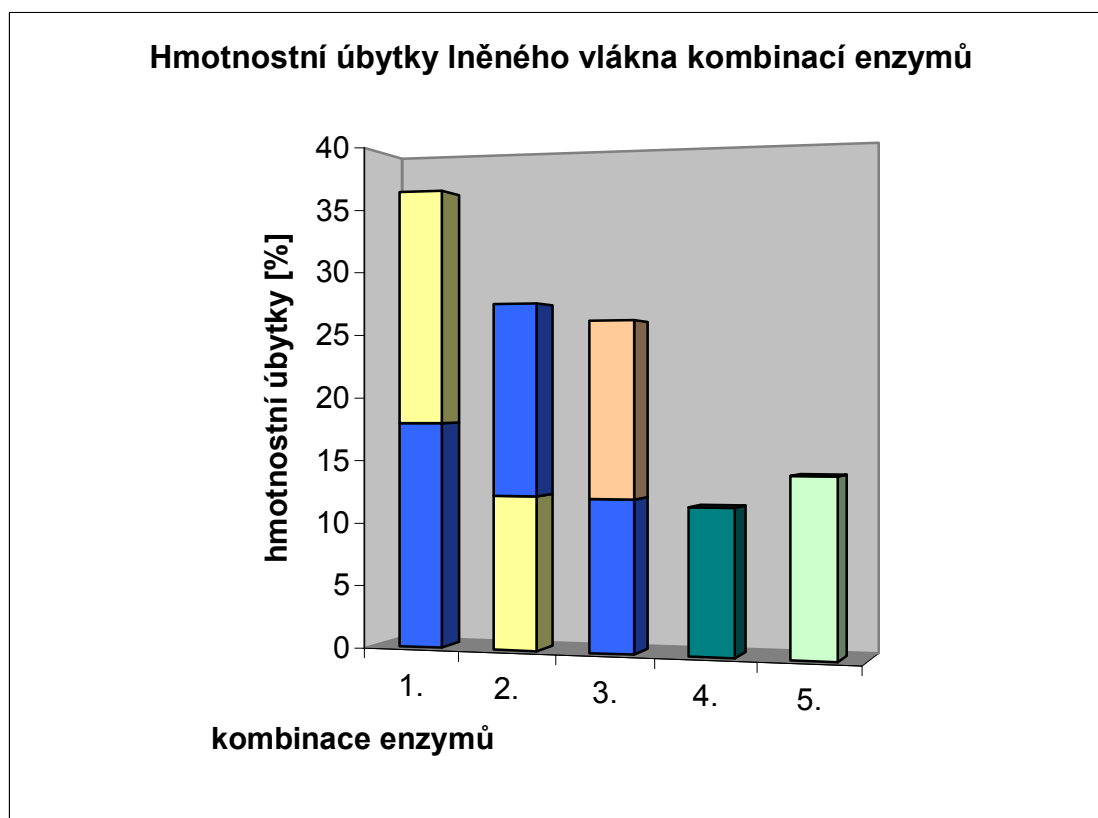
Tab. 8 Tabulka a graf hmotnostních úbytků kombinací enzymů:**LNĚNÉ VZORKY**

POSTUPNĚ:

vzorek	enzym - vlastní kombinace	1. hmotností úbytek [%]	2. hmotností úbytek [%]	celkový hmotností úbytek [%]
1.	G 2 + G 3	18,01	18,59	36,6
2.	G 3 + G 2	12,22	15,27	25,49
3.	G 2 + G 1	12,07	14,01	26,08

DOHROMADY:

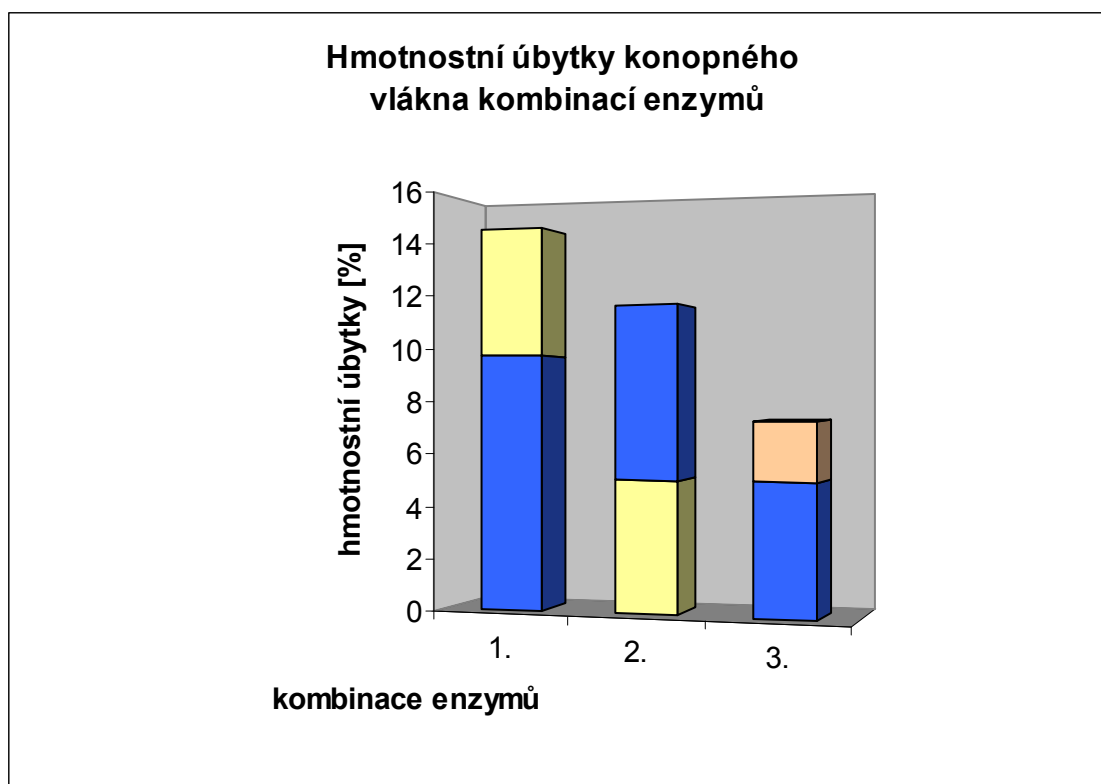
vzorek	enzym - vlastní kombinace	celkový hmotností úbytek [%]
4.	G 2 + G 3	11,54
5.	G 2 + G 3	14,03



Tab. 9 Tabulka a graf hmotnostních úbytků kombinací enzymů:**KONOPNÉ VZORKY**

POSTUPNĚ:

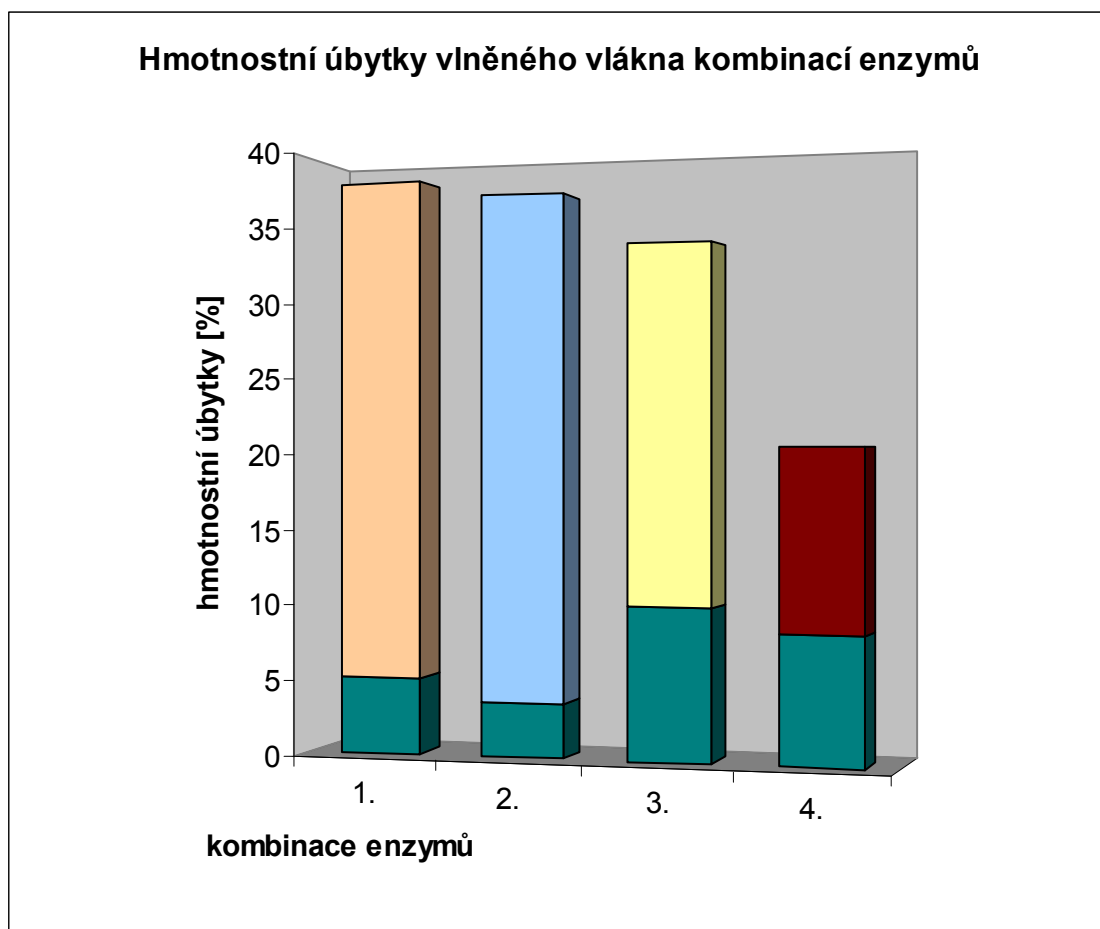
vzorek	enzym - vlastní kombinace	1. hmotností úbytek [%]	2. hmotností úbytek [%]	celkový hmotností úbytek [%]
1.	G 2 + G 3	9,77	4,85	14,62
2.	G 3 + G 2	5,04	6,59	11,63
3.	G 2 + G 1	5,042	2,256	7,298



Tab. 10 Tabulka a graf hmotnostních úbytků kombinací enzymů:**VLNĚNÉ VZORKY**

POSTUPNĚ:

vzorek	enzym - vlastní kombinace	1. hmotností úbytek [%]	2. hmotností úbytek [%]	Celkový hmotnostní úbytek [%]
1.	P 3 + P 2	5,06	33,18	38,24
2.	P 3 + P 7	3,59	33,64	37,23
3.	P 3 + P 5	10,12	23,72	33,84
4.	P 3+ E 1	8,49	12,07	20,56



4.6 Chromatografické testování hydrolytických štěpů

Chromatografie patří mezi separační metody, slouží k rozdělování vzorku na jednotlivé složky. Dělení látek probíhá na základě různých mechanismů; může to být adsorpce, rozdělování mechanickou výměnou iontů, vylukou (molekulová síta) aj. Rozdělování vzorku probíhá mezi dvěma navzájem nemísitelnými nebo jen omezeně mísitelnými fázemi, fází stacionární a fází mobilní.

Často používanou technikou při analýze enzymatických štěpů je papírová vzestupná chromatografie, která byla využita i zde. V podstatě jde o rozdělovací chromatografii se stacionární vodní fází a mobilní fází organického rozpouštědla. Jako chromatografický papír se používal papír Whatmen č. 4, jako vyvíjecí soustava směs: n-butanol : kyselina octová : voda v poměru 4 : 1 : 5. Pro detekci skvrn na chromatogramu bylo použito detekčního činidla 1 % roztoku ninhydrinu v acetonu.

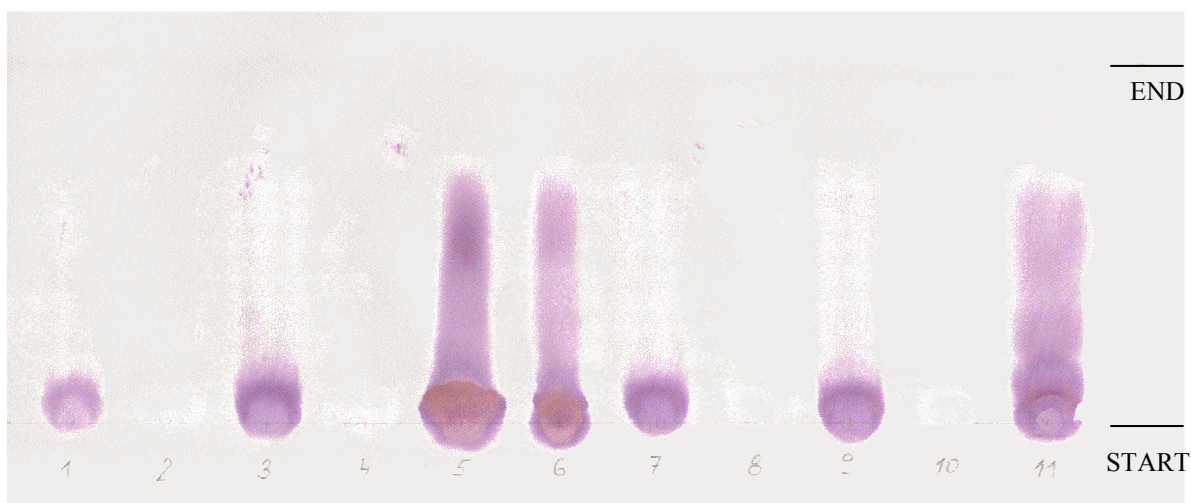
Experiment byl proveden dle následujícího postupu. Na spodní kraj chromatografického papíru, ve vzdálenosti 2 cm od okraje, se naznačila obyčejnou tužkou startovní linie. Na tuto linii se označily, 2 cm od sebe, místa nanášení jednotlivých hydrolyzátů. Pomocí mikropipety se pak hydrolyzáty nanasly na příslušná místa ve třech opakováních po 1 μ l. Výsledný objem tedy činil 3 μ l. Mezi jednotlivým nánosy se skvrny nechaly vždy pečlivě zaschnout. Následně se chromatogram vložil do chromatografické komory s předem připravenou mobilní fází. Doba vyvíjení činila cca 100 minut. Pak se chromatogram vyjmul a usušil při teplotě 80 °C v sušárně. Nakonec se chromatogram zdetegoval pomocí jemného postřiku detekčního činidla. Jednotlivé štěpy se objevily až po krátkém zahřátí v sušárně při teplotě 80 °C. Protože je zbarvení na světle nestálé, byl chromatogram ihned naskenován do digitální podoby.

4.6.1 Chromatografické testování směsí proteolytických enzymů

Pro studium vzájemné interakce proteolytických enzymů byla taktéž využita papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie na Silufolu. Postup testu se provedl shodně jako u hydrolytických štěpů.

4.6.2 Vybrané chromatogramy

I. Chromatografie hydrolyzátů po digesci celulóзовých vláken, *obr. 19*.



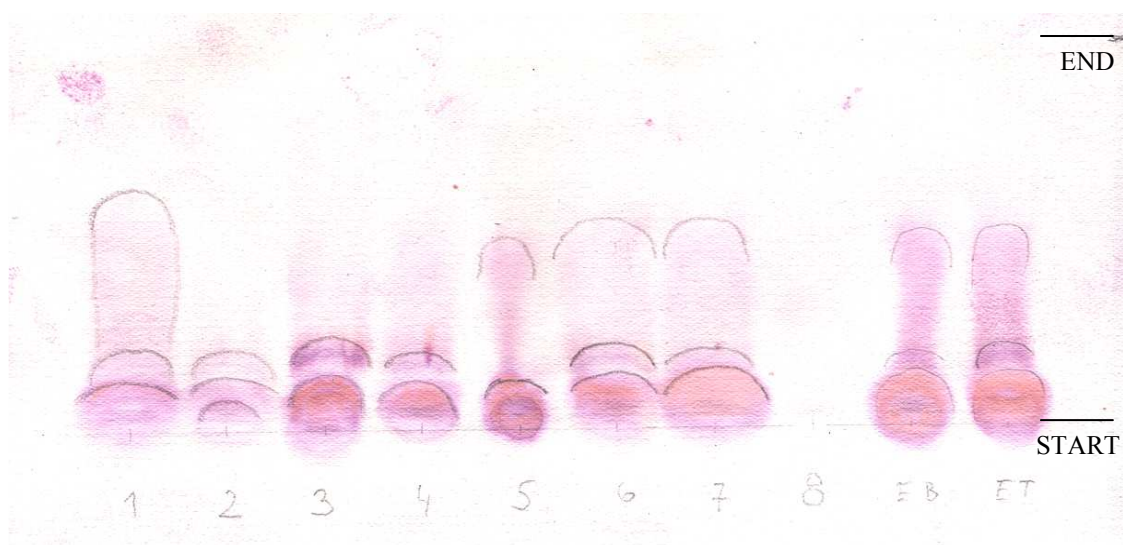
Obr. 19 Chromatogram hydrolyzátů po digesci celulóзовých vláken s legendou I.

Legenda I.:

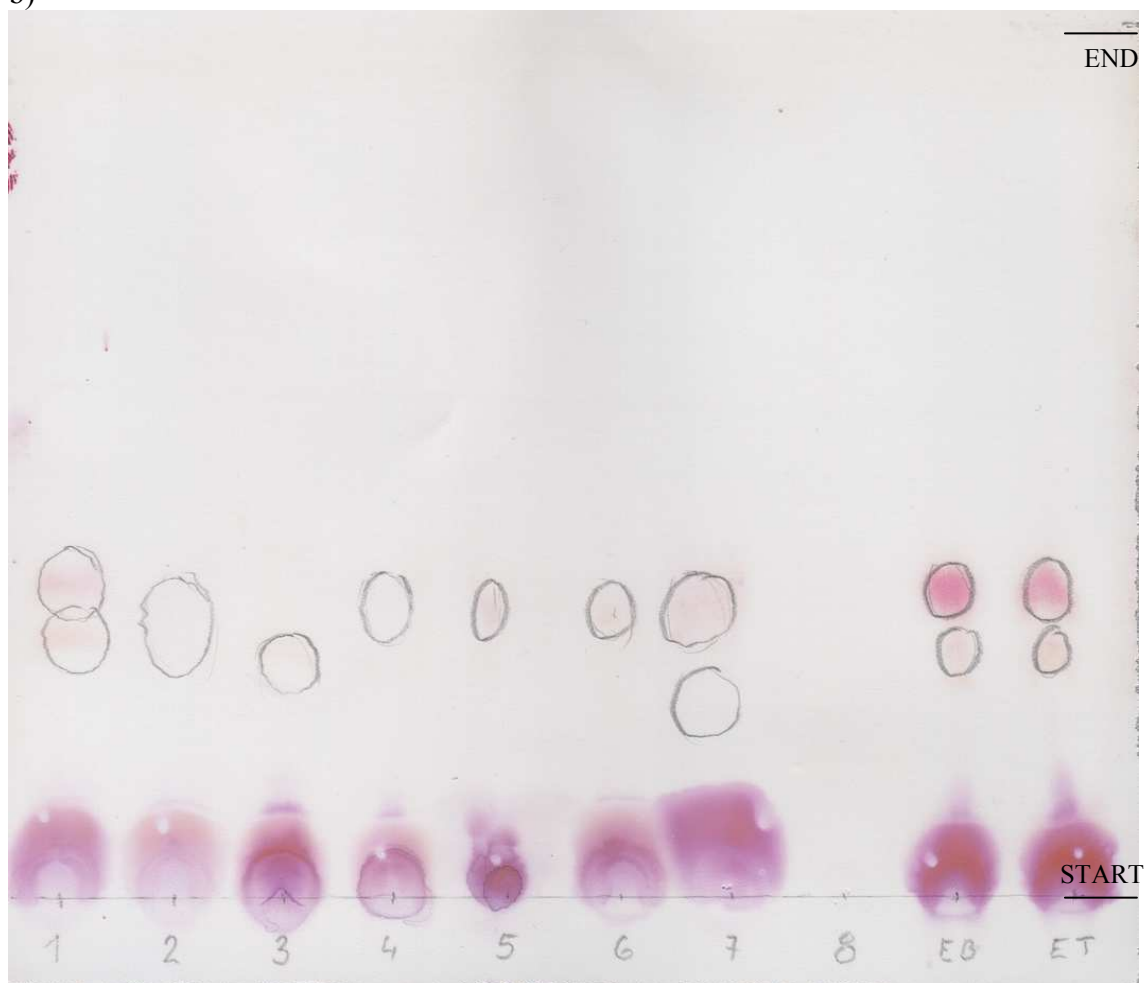
	hydrolyzáty
1.	BAVLNA + G 2
2.	BAVLNA + G 3
3.	BAVLNA + G 2 - min
4.	BAVLNA + G 3 - min
5.	BAVLNA + L 1
6.	BAVLNA + L 1 + G 2 dohromady
7.	LEN + G 2
8.	LEN + G 3
9.	KONOPI + G 2
10.	KONOPI + G 3
11.	BIOETHANOL ZE LNU

II. Chromatografie proteolytických enzymů a jejich směsí, *obr. 20.*

a)



b)



Obr.20 Chromatogram a) papír, b) Silufol proteolytických enzymů a jejich směsí s legendou II.

Legenda II.

	enzym
1.	P 2
2.	P 4
3.	P 7
4.	P 1
5.	E 1
6.	P 6
7.	P 5
8. = EB	E 1 + P 2
9. = ET	E 1 + P 7

4.7 Možnosti využití zbylých hydrolyzátů

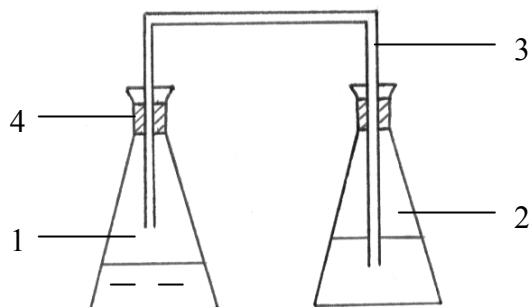
Při hledání možnosti využití zbylých hydrolyzátů se vycházelo z předpokladu, že se vlákna enzymaticky rozštěpí na peptidické štěpy u vlněného vlákna a na oligosacharidy až monosacharidy u celulóзовých vláken. Hydrolyzát z celulóзовých vláken byl proto podroben kvašení.

Pracovní postup digesce byl stejný jako u předchozích digestí popsaných v kap. 4.3 a 4.5, pracovalo se pouze s vyšším množstvím materiálu, tzn. s cca 1 g lněné tkaniny, která byla navíc ještě u druhého pokusu před digestí rozstříhána na nepravidelné kousky o velikosti cca 5 x 5 mm. Digeste probíhala za stejných podmínek jako v kap. 4.3. Výsledky váhových úbytků jsou uvedeny v **Tab. 11**.

Tab.11 Tabulka hmotnostních úbytků

	vzorek	enzym	hmotnostní úbytek [%]
1.	LEN	0,3 g enzymu G 3 / 50 ml pufru	11,19
2.	LEN	0,5 g enzymu G 3 / 50 ml pufru	49,35

Připravený hydrolyzát se vložil do přichystané kvasné soustavy, *obr. 21*, která se skládala z Erlenmayerovy baňky hydrolyzátem a z Erlenmayerovy baňky s vápennou vodou, které jsou utěsněně spojeny skleněnou trubičkou, která v baňce s vápennou vodou končí až pod hladinou vápenné vody.



Obr.21 Schéma kvasné aparatury, 1 – Erlenmayerova baňka s hydrolyzátem a kulturou kvasinek, 2 – Erlenmayerova baňka s vápennou vodou, 3 – skleněná trubička, 4 - těsnění

V první Erlenmayerově baňce došlo k procesu kvašení, uvolňoval se CO_2 , který byl jímán a odváděn do druhé baňky. V druhé baňce s vápennou vodou by CO_2 viditelný ve formě bublinek unikajících ze skleněné spojovací trubičky.

4.8 Vliv barvení textilního materiálu na enzymatickou digesci

Pro objasnění základních mechanismů enzymatické degradace textilních vláken se používaly neupravené materiály. Pro ucelenější přehled celé problematiky biodegradací se provedl experiment nastiňující možný vliv textilního barviva na průběh enzymatické digesce.

Vybraní zástupci textilních materiálů (len a vlna) se nejdříve určitým typem barviva obarvily. Pracovní postup obarvení materiálu byl principiálně shodný s prakticky používaným průmyslovým postupem barvení, vzhledem k laboratorním podmínkám byl pouze zjednodušen.

Složení barvicí lázně:

a) VLNA

1. Kyselé barvivo

1 : 50

2 % Egacidová oranž GG

2 - 4 % H_2SO_4 konc.

5 - 10 % Na_2SO_4

pH 2

2. 1 : 1 kovokomplexní barvivo

1 : 50

2 % Chromolanová modř GG

10 % H_2SO_4 konc.

10 - 20 % Na_2SO_4 kalc.

pH 2

3. 1 : 2 kovokomplexní barvivo

1 : 50

2 % Ostala bordo FGRL

2 - 5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

pH 5

4. Alizarinové chromové barvivo

1 : 50

2 % Alizarinová brilantní zeleň Gex.

3 - 6 % CH_3COOH konc.

5 - 10 % Na_2SO_4 kalc.

pH 4 - 5

v čtvrtině délky barvení okyselení

1 - 2 % HCOOH

v polovině délky barvení

chromování 1 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

5. bez barviva

1 : 50

1 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

3 - 6 % CH_3COOH konc.

5 - 10 % Na_2SO_4 kalc.

b) LEN

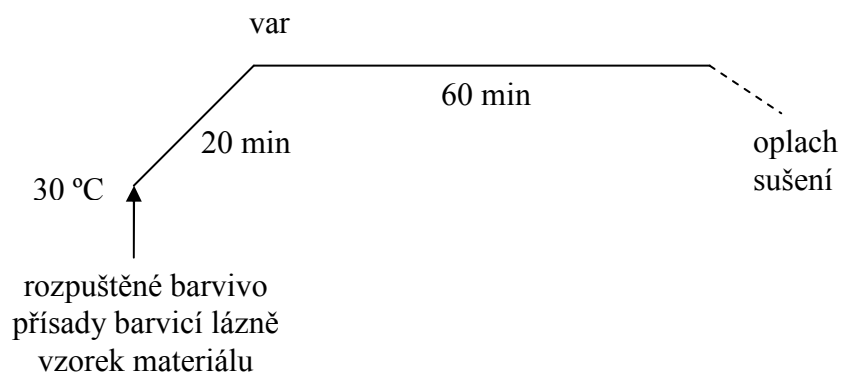
přímé barvivo:

1 : 50

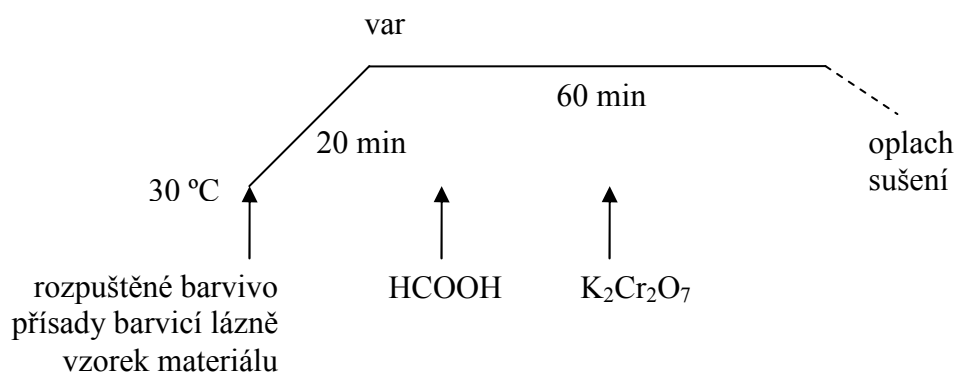
2 % Saturnová violet L4B

Barvicí režim:

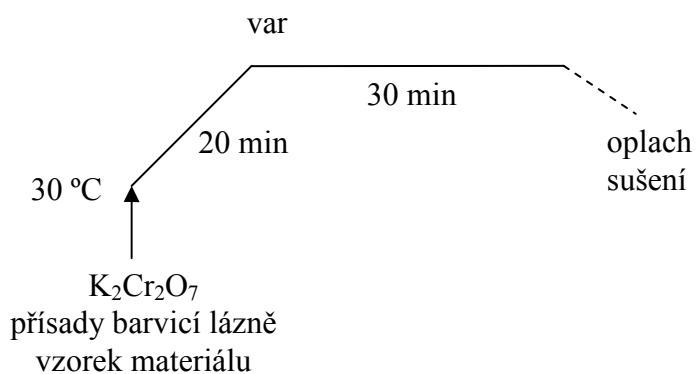
a) 1., 2., 3., b)



a) 4.



a) 5.



Po barvení, oplachu a sušení následovala enzymatická digesce způsobem popsaným v kap. 4.3. Hmotnost vzorku zkoušeného materiálu byla 0,5 g. Výsledky pokusu jsou shrnuty v **Tab. 12**.

Tab. 12 Tabulka hmotnostních úbytků, hodnocení barvy hydrolyzátu a zbylého vzorku

a) VLNA

	druh barviva	hmotností úbytek [%]	hydrolyzát *	vzorek **
1.	KYSELÉ BARVIVO	9,40	středně zabarven	středně odbarven
2.	ALIZARIN.CHROM. BARVIVO	8,42	slabě zabarven	neodbarven
3.	1:1 KOVOKOMPLEX. BARVIVO	6,94	slabě zabarven	neodbarven
4.	1:2 KOVOKOMPLEX. BARVIVO	3,37	nepatrně zabarven	neodbarven
5.	SLEPÁ CHROMOVACÍ LÁZEŇ	3.76	-	-

* škála pro hodnocení hydrolyzátu: zabarven silně, středně, slabě, nepatrně, nezabarven

** škála pro hodnocení vzorku: odbarven silně, středně, slabě, neodbarven

b) LEN

	druh barviva	hmotností úbytek [%]	hydrolyzát *	vzorek **
1.	PŘÍMÉ BARVIVO	20,36	středně zabarven	středně odbarven

5. DISKUSE VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR

Záměrem této diplomové práce bylo sestavení a zkombinování různých typů enzymů k dosažení efektivní degradace textilních vláken. Tato myšlenka vyvstala díky neutěšenému stavu v odpadovém textilním hospodářství, což je naznačeno již v úvodu práce. Protože odborné informace v této problematice zcela absentují nebo jsou záměrně utajovány, bylo nelehké se zorientovat v této oblasti, a proto se i experimenty musely podrobit jednoduchému a přehlednému provedení.

Nejdříve bylo nutné vybrat a předupravit textilní materiály. Přirozeně se práce nejprve soustředila na přírodní textilní materiál (pektinocelulózová a lignocelulózová, proteinová vlákna) a umělá vlákna se otestovala jen okrajově. Z důvodů získání základních informací se experimenty provedly na nebarveném neupraveném materiálu. Materiál byl ve formě tkaniny, což modeluje právě podobu nesnadno zpracovatelného textilního odpadu jako je obnošené šatstvo. Pro odstranění veškerých nečistot a výrobních úpravnických prostředků byl materiál důkladně vyprán, oplachován a sušen.

Podle druhu textilního materiálu byly pak vybíraly příslušné enzymy. Výběr enzymů pro degradaci se řídil především podle substrátové specifity enzymu, ale byl brán zřetel i na ekonomické hledisko a možnost dostupnosti enzymu. Následně se provedla enzymatická digesce jednotlivými enzymy a zjistil se procentuální hmotností úbytek digescí. Přitom se musely vhodně zvolit reakční podmínky enzymatické digesce, neboť ty mají rozhodující vliv na celkový průběh a následný úspěch enzymatické digesce. Mezi reakční parametry patří koncentrace enzymu a substrátu, hodnota pH a teplota lázně, doba digesce a v neposlední řadě i cirkulace lázně.

Zde se projevila právě nezaměnitelná výhoda enzymů - přírodních biokatalyzátorů, protože jsou schopny, na rozdíl od umělých katalyzátorů a dalších procesů, pracovat za mírných reakčních podmínek (teplota 20 až 40 °C, pH 5 – 7, tlak 0,1 MPa) [2]. Zvolené pracovní reakční podmínky vhodně korespondovaly s optimálními podmínkami konkrétně použitých enzymů. Většina použitých enzymů má totiž optimální pH v oblasti neutrální, jsou produktem mezofilních mikroorganismů nebo živočichů s enzymatickou termostabilitou do 50 °C. Zvolená koncentrace enzymu a doba digesce dostatečně podporují aktivitu a dobu činnosti enzymu na substrátu.

Enzymy se totiž pro potřebu pružné regulace v organismu stále odbourávají a znovu syntetizují.

Tyto srovnatelné reakční podmínky umožňují vzájemné porovnávání účinnosti enzymů. Jednotlivé procentuální hmotnostní úbytky materiálů příslušnými enzymy jsou uvedeny v experimentální části kap. 4.3, 4.5, 4.7 a 4.8. Pro přehlednost je zde uvedena pouze **Tab.13**.

Tab.13 Souhrnné hmotnostní úbytky samostatnými enzymy

materiál	hmotnostní úbytky [%]
BAVLNA	2 - 8
LEN	6 - 18
KONOPI	5 - 9
VLNA	3 - 8
VISKOZA	18
POLYESTER	pod 1

Enzymy štěpí povrchovou vrstvu vlákna a pomocí této rozvolněnější povrchové struktury pronikají do hlubších vrstev vlákna.

Celkově nejvyšší procento úbytku bylo zjištěno u lignocelulózových materiálů (len a konopí). Přes výraznou podobnost obou vláken se projevil vliv rozdílného procentuálního zastoupení stavebních látek ve vlákně. Naproti tomu byla enzymatická degradace zanedbatelná u polyesterových vláken.

Zajímavé jsou výsledky u vlněného vlákna. Podle velikosti váhového úbytku je možné se domnívat, že ve vlně je určité množství elastinových makromolekul. V odborné literatuře zabývající se strukturou vlněného vlákna se ale tato informace nevyskytuje.

Naopak výsledky z degradace bavlněného materiálu výborně korespondují s teorií struktury tohoto vlákna.

Protože textilní vlákna jsou složena z různých vrstev, které se vzájemně liší svou funkcí i chemickým složením, byly sestaveny cílené kombinace enzymů pro dosažení maximální degradace. Tyto kombinace byly stanoveny podle výsledků předešlých

pokusů a hodnocení se provedlo opět pomocí váhových úbytků, které jsou uvedeny v experimentální části kap. 4.5. Pokusy se prováděly dvojím způsobem. Při prvním způsobu se digestce realizovala v jenom samostatném roztoku enzymu a následně pak samostatně v druhém roztoku enzymu do kombinace, ozn. *postupně*. Při druhém postupu se vybrané materiály (bavlna a len) zpracovaly ve společném roztoku dvou enzymů, ozn. *dohromady*. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v **Tab. 14**.

Tab. 14 Souhrnné výsledky kombinací enzymů

POSTUPNĚ:

materiál	hmotnostní úbytky [%]
BAVLNA	3 - 12
LEN	25 - 36
KONOPI	11 - 14
VLNA	20 - 38

DOHROMADY:

materiál	hmotnostní úbytky [%]
BAVLNA	3
LEN	11 - 14

Je patrné, že při realizaci způsobem *dohromady* se dosahovalo výrazně nižších váhových úbytků. Vysvětlením byl mohla být teorie o vzájemném vytěsňování jednotlivých enzymů při společné aplikaci, jejíž příčinnou je rozostřená specifita – substrátová konkurence enzymů. Tento fakt je způsoben tím, že z ekonomických důvodů se nepoužívaly drahé vysoce čisté specifické enzymy. Před degradací je tedy potřeba vždy stanovit přesnou hierarchii enzymů k dosažení maximálních výsledků.

Při postupu *postupně* se naopak hmotností úbytky zvýšily na dvojnásobek, u vlněného materiálu dokonce až na čtyřnásobek oproti degradaci jednotlivými enzymy. Lněný a vlněný materiál tak jde snadno rozložit na cca 30 %, v praxi to pak činí 300 kg z jedné tuny materiálu. Struktura tkaniny je přitom již značně rozvolněná a ztrácí na mechanických vlastnostech, rozpadá se. Přibližně od 15 % váhového úbytku je již tato rozvolněnější struktura patrná.

Při průběžném makroskopickém sledování jednotlivých materiálů po digesti se objevil u lněného a konopného materiálu vjem příjemnějšího omaku. Nabízí se tedy představa, že by se limitovaná enzymatická digestce mohla použít u těchto materiálů k úpravě omaku.

Po digesci se zbylé hydrolyzáty uchovaly pro následné hodnocení tenkovrstvou chromatografií, jejíž postup je popsán v kap. 4.6. Chromatografické testování štěpů nelze blížeji komentovat, protože rozsah a finanční zajištění diplomové práce neumožňovalo použít příslušných chromatografických standard. I přesto dokumentované výsledky ukazují, že relativně jednoduchá tenkovrstvá chromatografie může být vhodným nástrojem popisu enzymaticky vzniklých nízkomolekulárních štěpů.

Chromatograficky byla zkoušena i vzájemná interakce proteolytických enzymů. Výsledky dokazují, že enzymy jako bílkoviny se vzájemně neštěpí. Teoreticky lze proto používat enzymatických směsí proteolytických enzymů. Tohoto tvrzení je však nutno ověřit dalšími praktickými pokusy, které by ukázaly, zda si proteolytické enzymy ve směsi vzájemně nekonkurují o místa na substrátu, jako bylo zjištěno při pokusu s glykosidasovými enzymy.

Zbylé hydrolyzáty nabízejí několik možností využití. Po digesci vlny zůstává v hydrolyzátu značné množství jak samotných aminokyselin, tak i vyšších organických zbytků z vláken. Tyto biologicky hodnotné hydrolyzáty by se mohly následně zpracovat a využít v zemědělském průmyslu do krmných směsí nebo na výrobu hnojiv či uplatnit jako přísada do kosmetických přípravků.

V hydrolyzátech po degradaci celulózových vláken jsou zase oligosacharidy až monosacharidy, proto byly využity tyto cukry ke kvašení.

Nesmí se přehlédnout ani výrazný nárůst hmotnostního úbytku vlivem rozstříhání. Rozstříháním a mechanickým rozvolněním se enzym snadněji dostává k povrchu substrátu a může lépe pracovat. V průmyslovém využití by bylo tedy vhodné zařadit před samotnou enzymatickou digescí zpracování materiálu na trhacím či řezacím stroji.

Pro ucelenější přehled celé vytýčené problematiky se provedl experiment také s barvenými textilními materiály, který nastiňuje vliv barvení na enzymatickou digesci. Jako zástupce textilních materiálů byla zvolena vlna a len, nejen pro své vysoké hmotnostní úbytky, ale také pro typy barviv, které by potencionálně mohly měnit průběh digesce.

Podle získaných výsledků se vliv barviva ale jen těžko diskutuje, neboť obecným problémem je nedostatečný strukturální a histochemický popis příslušných textilních vláken. Z toho vyplývá, že není exaktně známo na jaké konkrétní substance se

použitá barviva váží. Proto ani výsledky se nemohou uspokojivě vysvětlit. Je pouze patrné výraznější odbarvení vzorku vlny obarvené kyselým barvivem a u lnu obarveným přímým barvivem, což vede k úvaze, že příslušný enzym napadá povrchovou obarvenou vrstvu a uvolňuje i barvivo do hydrolyzátu. Naopak u vlny obarvené 1:2 kovokomplexním barvivem se vzorek neodbarvil a v hydrolyzátu byly jen stopy uvolněného barviva. Pravděpodobně je barvivo navázáno ve vrstvách, které jsou hlouběji ve vláknech a ke kterým enzym už nepronikl.

Na základě výsledných hmotnostních úbytků je možná i další teorie. Barviva pro vlnu obsahují často atom kovu, který zajišťuje dobré stálosti barviva na vláknech. Tento atom kovu (Cr nebo Co) může však ovlivnit enzym, inaktivovat ho. To se ukázalo u obarvené vlny v případě barviva 1:2 kovokomplexního a vzorku vlny pro srovnání zpracovaným pouze v chromovací lázni. Hmotnostní úbytky zde klesly na třetinu obvyklé hodnoty z předchozích měření. U vzorku vlny barvené 1 : 1 kovokomplexním barvivem činil váhový úbytek pouze 2/3 obvyklé hodnoty. Jinak u ostatních vzorků nebylo zjištěno výrazné ovlivnění enzymatické digesce barvivem. Pro objasnění této teorie by však bylo nutné ověřit ji přímým inhibičním efektem příslušných barviv na aktivitu použitých enzymů. Detailní studium nastíněné problematiky je však již nad rámec této diplomové práce, proto bude jistě námětem pro další práci.

Předložené výsledky ukazují, že enzymy lze využít k vysoce ekonomicky a ekologicky vhodnému způsobu degradace přírodních textilií, tedy hlavně textilního odpadu. Pro tyto účely však nelze používat komerčně dostupných a čistých enzymatických preparátů, ale jejich bakteriálních producentů. Vytipování těchto producentů však musí být předmětem dalšího a technologicky zaměřeného studia. Velmi lákavá je realistická možnost výroby ethanolu z celulóзовého textilního odpadu.

Bibliografie:

- [1] GLEN, W., NEU, S.: *Enzymy – jak působí pomáhají a léčí*, Biocentrum-E Praha 1990
- [2] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*, Academia Praha 1996
- [3] HORSKÁ, I.: *Tese k disertační práci – Enzymologie a biochemie ovčího vlákna*, 2005
- [4] MACHAŇOVÁ, D.: *Předúprava vláken I.*, TUL 2005
- [5] MOJŽÍŠ, B. A KOL.: *Len, jeho historie, pěstování, zpracování a užití*, SNTL Praha 1988
- [6] ENZYMATIC BIOPOLYMER ENGINEERING: *Enzymatic modification of keratinous fibres*, Bulgaria 2004, by: <http://www.vtt.fi/bel/cost847>
- [7] SCHINDLER, W., D., HAUSER, P., J.: *Chemical Finishing of Textiles*, CRC Press, England 2004
- [8] HORSKÁ, I., WIENER, J., KRUTSKÁ, Š.: *Degradation of Textile Fibre by Enzymes*, 4 th Central European Conference, Liberec 2005
- [9] PASTER INSTITUTE, UNIVERSITY OF GHEN: *Cellulose Degradation by Clostridium Thermcellum*, France 2000
- [10] SZOSTAK-KOTOWA, J.: *Biodeterioration of Textiles*, Academia Ekonomiczna w Krakowie, Poland 2003
- [11] CZILIK, M. et al.: *Effects of Reactive Dyes on the Enzymatic Depolymerization of cellulose*, Dyes and Pigments 2002
- [12] SADELNIK, N.: *Properties of Hemp Fibre Cottonised by Biological Modification on Hemp Hackling Noils*, Fibres & Textiles in Eastern Europe 2004
- [13] SARKAR, A., K., ETTERS, J., N.: *Enzymatic Hydrolysis of Cotton Fibres*, The Journal of Cotton Science 2004
- [14] KRČMA, L.: *Degradace textilních vláken a ochrana proti ní*, SNTL Praha 1976
- [15] FIBER ECONOMICS BUREAU: *FibreWorld*, <http://www.fibersource.com>
- [16] MILITKÝ, J.: *Textilní vlákna – klasická a speciální*, TUL 2002
- [17] HLADÍK, V. A KOL.: *Textilní vlákna*, SNTL 1970
- [18] REDNOVA: *Internal structure of mature and immature cotton fibers revealed by scanning probe microscopy*, 2003, <http://www.rednova.com>

- [19] THOMSEN, A., B.: *Hemp raw materials*, Biosystems Department 2005
- [20] ŠUTÁ, A., BLAŽEJ, A., *Vlastnosti textilních vláken*, Alfa Bratislava 1982
- [21] WOLF, J.: *Histologie*, SZN Praha 1968
- [22] HRČKOVÁ, M.: *Biochemické vlastnosti Proteolytických enzymů*, Chem. Listy 2004
- [23] BEYON, R., BOND, J., S.: *Proteolytic Enzymes*, Oxrord University Press, New York 2001
- [24] WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION: *Biochemicals*, www.worthington-biochem.com
- [25] MOSS G.P.: *Enzyme nomenclature*,
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- [26] SUSSMAN, J.: Carboxylesterase type B-signatures, www.expasy.org 2001
- [27] KAŠTÁNEK, F.: *Bioinženýrství*, Academia Praha 2001
- [28] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie 3*, Academia Praha 1993
- [29] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia Praha 2002
- [30] MERTA, P.: *Základy biotechnologií*, Vysoká škola báňská, Ostrava 1994
- [31] HORÁK, J.: *Nový úkol pro chemický průmysl*, Chem Listy 98, 2004
- [32] NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY: *Cellulose Conversion Key to Fuel of Future*, 2004
- [33] OREGON ENERGY OFFICE: *Cellulose-Ethanol Production Technology*, 2004

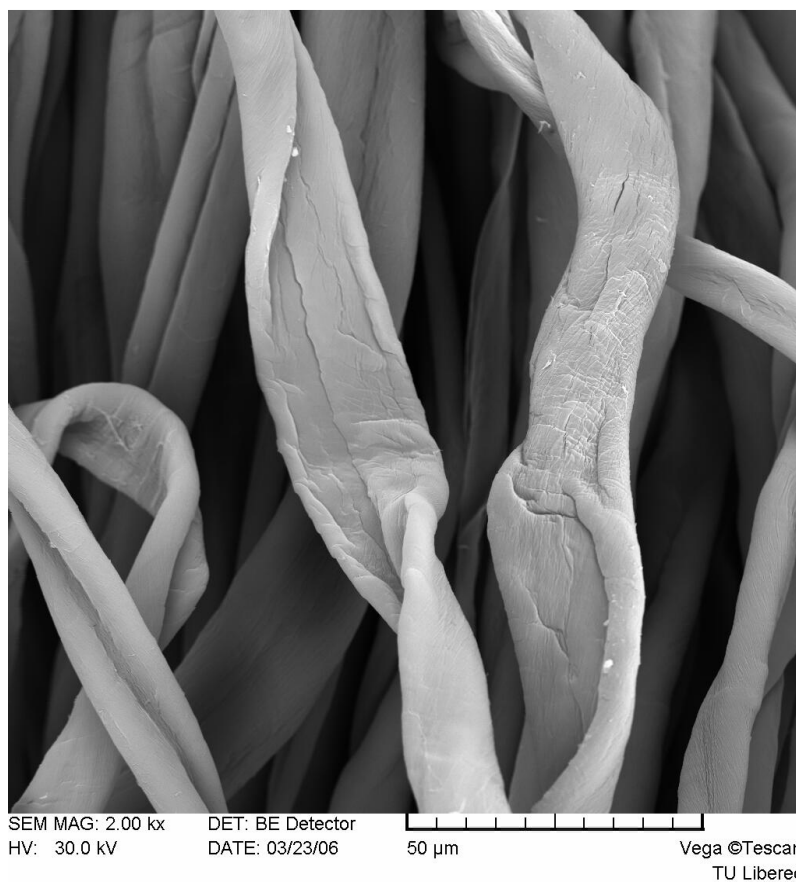
Dodatek A - Obrazová příloha

Snímky byly pořízeny na rastrovacím elektronovém mikroskopu, který se nachází na Katedře textilních materiálů fakulty textilní Technické univerzity v Liberci. Pro srovnání je na *obr. 22, 23, 24* vybrán snímek původního materiálu a snímek materiálu po enzymatické digesci.

Na snímku materiálu po enzymatické degradaci je na první pohled zřejmé, na rozdíl od původního materiálu, značné rozrušování povrchových vrstev vlákna s postupným odlupováním těchto vrstev, *obr. 22 (2), 24 (2)*. U lněného materiálu, *obr. 23(2)*, je dokonce už odstraněna povrchová vrstva, vlákno je tedy hladší. Pouze na vlákne uprostřed snímku je vidět silně narušená ale ještě neodstraněná vnější vrstva.

Obr. 22 Bavlna

1 – původní
vlákna

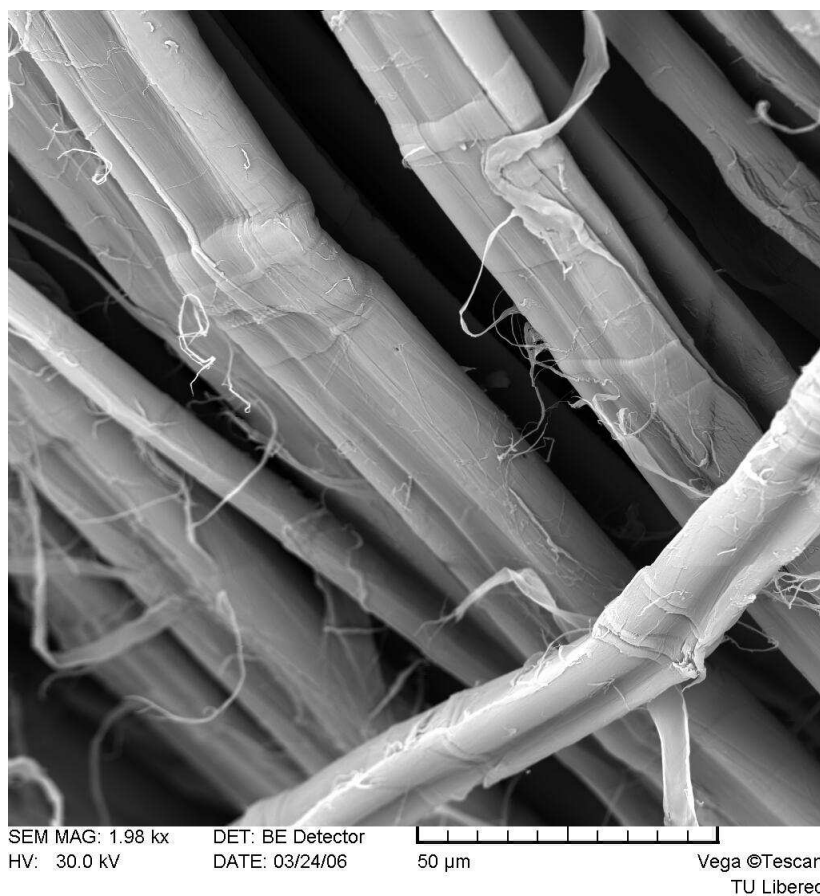


2 – vlákno
po enzyma-
tické digesci
(L 1 + G 2)

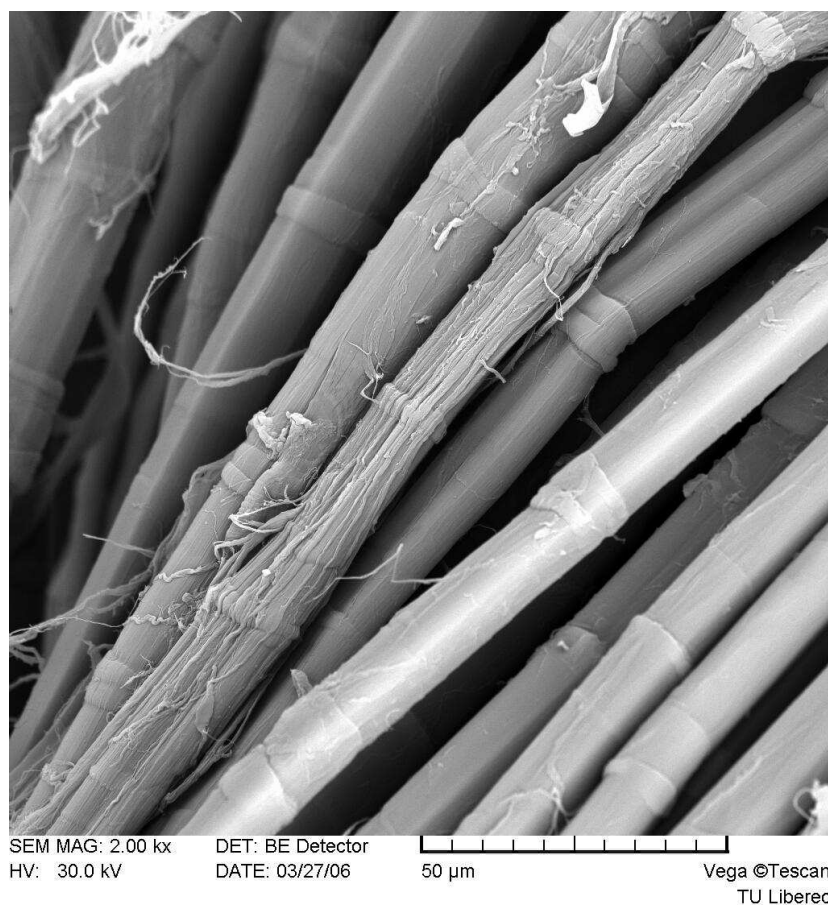


Obr. 23 *Len*

1 – původní
vlákna

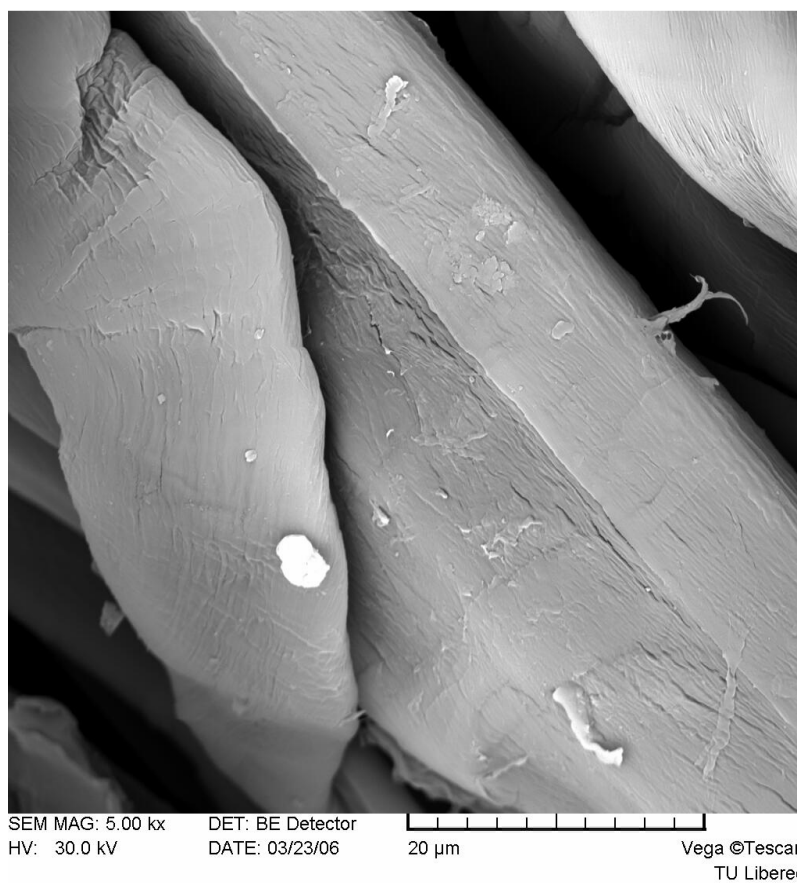


2 – vlákna
po enzyma-
tické digesci
(G 3)



Obr. 24 Konopí

1 – původní
vlákna



2 – vlákno
po enzyma-
tické digesci
(G 2 + G 1)

